

**KAREN FRANCINE KÖHLER**

***Estudo de associação de variantes do gene  
FASL e pênfigo foliáceo endêmico***

Monografia apresentada ao Curso de  
Ciências Biológicas, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas,  
Setor de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Paraná.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Luiza  
Petzl-Erler

**CURITIBA  
2003**

*A todos aqueles que estiveram ao meu  
lado, me apoiando durante esses  
anos de graduação.*

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Luiza, principal responsável por esta conquista, pelos quatro anos de orientação e amizade.

Aos meus pais e irmão, pelo esforço, apoio, carinho e compreensão, essenciais para a conclusão desta etapa.

Às colegas e amigas do Laboratório de Genética Molecular Humana: Danielle, Márcia, Liana, Luiza e Noemi, pelos agradáveis momentos de trabalho e companheirismo.

À Valéria e a Karin, pela amizade e pelo conhecimento compartilhado.

Ao professor Karam, pela amizade, e demais professores do Departamento de Genética que contribuíram para a minha formação como bióloga.

Ao Felipe, pela compreensão e apoio em todas as horas.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	V
I-INTRODUÇÃO.....	1
II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
II.1-Pênfigo Foliáceo.....	3
II.1a-Histórico.....	3
II.1b-Etiologia.....	6
II.1c-Aspectos clínicos.....	8
II.1d-Aspectos genéticos.....	9
II.2-O Ligante de Fas ( <i>FasL</i> ).....	11
II.2a-Introdução.....	11
II.2b-O gene <i>FASL</i> e seu produto gênico.....	11
II.2c-Funções do sistema Fas/FasL.....	13
II.2d-Variabilidade alélica de <i>FASL</i> .....	18
II.2e-Estudos de associação a doenças.....	23
III-OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS.....	26
IV-MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
IV.1-Amostra Populacional.....	27
IV.2-Metodologia.....	27
IV.2a-Extração de DNA.....	27
IV.2b-Tipagem do gene <i>FASL</i> .....	28
IV.2c-Análise dos dados.....	30
IV.2d. Soluções.....	31
V-RESULTADOS.....	32
VI-DISCUSSÃO.....	37
VII-CONCLUSÃO.....	40
VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condições utilizadas para a amplificação do gene <i>FASL</i> .....	28
<b>Tabela 2.</b> Condições utilizadas para a ciclagem do gene <i>FASL</i> .....	29
<b>Tabela 3.</b> Frequências alélicas para os subgrupos de pacientes e controles.....	32
<b>Tabela 4.</b> Frequências genotípicas para os subgrupos de pacientes e controles.....	34
<b>Tabela 5.</b> Teste de homogeneidade entre os subgrupos de pacientes e controles.....	34
<b>Tabela 6.</b> Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os subgrupos de pacientes e controles.....	34
<b>Tabela 7.</b> Análise de associação considerando as frequências alélicas para a posição –843 do gene <i>FASL</i> para os subgrupos de pacientes e controles.....	35
<b>Tabela 8.</b> Análise de associação considerando as frequências genotípicas para a posição –843 do gene <i>FASL</i> para os subgrupos de pacientes e controles.....	36

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pacientes com pênfigo foliáceo.....	4
<b>Figura 2.</b> Pacientes com pênfigo vulgar.....	4
<b>Figura 3.</b> Organização interna do gene <i>FASL</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Célula T CD8 efetora agindo sobre célula-alvo infectada por vírus, através do peptídeo Fas e seu ligante, além de outras citocinas.....	14
<b>Figura 5.</b> Esquema de duas diferentes vias do processo de apoptose.....	15
<b>Figura 6.</b> Sequência nucleotídica do gene <i>FASL</i> e algumas variantes descritas.....	19
<b>Figura 7.</b> Microsatélite <i>FASL</i> e a montante da região promotora.....	23
<b>Figura 8.</b> Eletroforese de produtos de PCR do gene <i>FASL</i> em gel de agarose.....	33
<b>Figura 9.</b> Eletroforese de produtos de PCR do gene <i>FASL</i> em gel de poliacrilamida.....	33

## I-INTRODUÇÃO

A genética começou a desenvolver-se, com o redescobrimto das Leis de Mendel, em 1900. A descoberta do material genético e a elucidação de sua estrutura, ocorrida meio século após, proporcionaram novo progresso nessa área. A partir da década de 1980, o avanço da tecnologia permitiu o desenvolvimento de novas técnicas de investigação genômica. A tecnologia do DNA recombinante, principalmente com a descoberta da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) feita por Mullis em 1985, trouxe novas abordagens e aplicações em estudos populacionais e na elucidação da base genética de doenças.

Uma forma de detectar genes envolvidos em doenças multifatoriais ocorre através do estudo caso-controle. Neste tipo de análise, um grupo de pacientes (não relacionados geneticamente) e um grupo de indivíduos controle, tem suas frequências alélicas para genes candidatos determinadas. Diferenças significativas nessas frequências geram indícios de associação do gene ao desenvolvimento da doença, bem como informam qual(is) alelo(s) estão associados à ela.

Neste trabalho, foi realizado um estudo do tipo caso-controle, para análise de associação entre a doença pênfigo foliáceo e uma posição variante do gene *FASL*. Os grupos de pacientes e controles foram constituídos da maneira mais homogênea possível, levando em conta faixa etária, grupo étnico e estilo de vida.

Pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune caracterizada por bolhas e erosões na pele, provocadas por auto-anticorpos patogênicos com especificidade para moléculas componentes da epiderme. Apesar de possuir ocorrência mundial, é encontrada em maior frequência na América do Sul. Possui alta prevalência em várias áreas rurais do Brasil, onde casos familiares são mais frequentes. Acomete principalmente adultos jovens e crianças. O PF é uma doença de causa ainda desconhecida. Sabe-se que vários fatores estão envolvidos na sua patogênese, entre eles os fatores ambientais e genéticos.

A escolha do gene candidato a ser analisado, baseia-se no conhecimento da função do seu produto e no seu polimorfismo. O gene que codifica o ligante de Fas (FasL), é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), sendo um agente indutor da apoptose ao reconhecer o antígeno Fas. Em humanos, FasL, tanto na sua forma ligada a membrana ou na sua forma solúvel, pode induzir citólise de células que estejam expressando o antígeno Fas. A

posição analisada consiste em uma variação de ponto (C→T), localizada na posição -843 da região promotora do gene *FASL*.

Devido ao caráter multifatorial e complexo de predisposição ao pênfigo foliáceo, a elucidação de fatores que possam causar suscetibilidade ou proteção a esse distúrbio, contribuirá para o desenvolvimento de novas terapias, medidas preventivas, e até mesmo para a busca da cura da doença.

## II-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### II.1-PÊNFIGO FOLIÁCEO

#### II.1a-Histórico

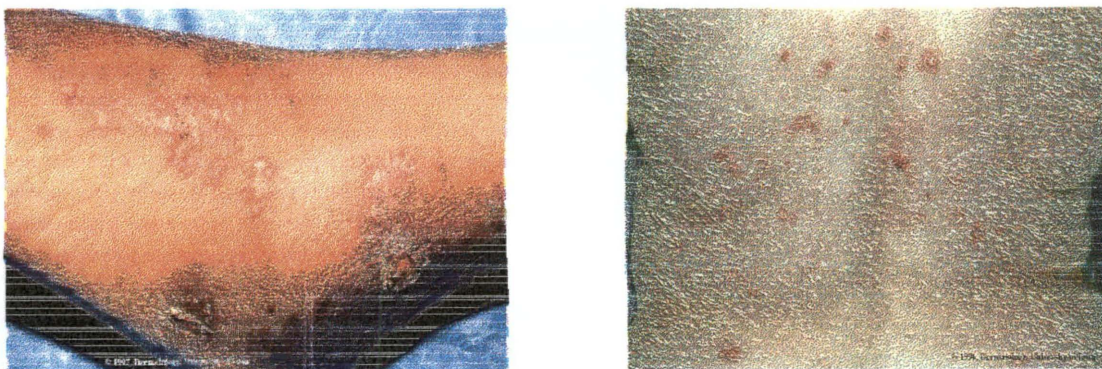
O termo pênfigo refere-se a um grupo de doenças bolhosas intraepidérmicas da pele e mucosas, ou somente na pele, possuindo características autoimunes, apresentando autoanticorpos antiepidérmicos (JONES e cols., 1984). É uma doença de causa ainda desconhecida, endêmica no Brasil, existindo em menor escala em outros países da América Latina e Central (do México à Argentina) e até mesmo na Tunísia, onde se encontra a forma esporádica da doença.

Hipócrates já mencionava o termo *pyretoi pemphigoides*, para designar doenças associadas a bolhas. No século XVIII, o termo pênfigo foi reintroduzido, indicando todas as doenças que causavam bolhas. Porém, atualmente já foram caracterizadas várias formas de pênfigo, sabendo-se dessa maneira que este possui características distintas de outras doenças que causam bolhas na pele, como por exemplo, o caráter autoimune das diversas formas de pênfigo encontradas (AHMED, 1980; HOLUBAR, 1989; *apud* PAVONI, 2000).

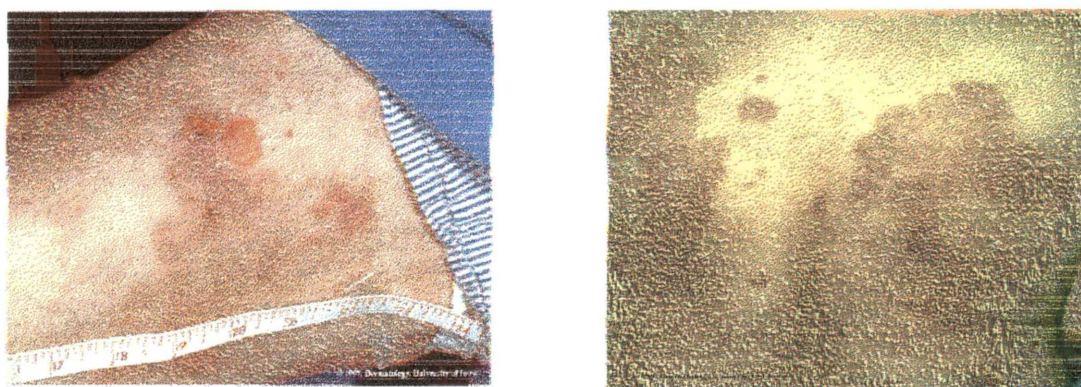
Dois tipos de PF são hoje reconhecidos: o clássico, que é raro e ocorre esporadicamente em todo o mundo, e o endêmico (PFE), também conhecido como fogo selvagem (FS) nome originado do fato das lesões serem dolorosas, com sensação de ardência e queimação (CAMPBELL e cols., 2001).

Baseando-se em características clínicas e histopatológicas, conhece-se dois tipos principais de pênfigo: o vulgar (*pemphigus vulgaris*), descrito por Willan em 1808 e Hebra em 1860, e o foliáceo (*pemphigus foliaceus*), conhecido também como *fogo selvagem* (FS) descrito por Cazenave em 1844 (*apud* THIVOLET, 1994). Enquanto o pênfigo foliáceo (PF) (figura 1) é caracterizado por pequenas bolhas que rapidamente se tornam erosões, formando regiões avermelhadas recobertas por escamas e crostas, o pênfigo vulgar (PV) (figura 2) possui uma forma mais complexa. Além da formação de bolhas na epiderme, ocorre erosão das membranas mucosas, promovendo perda de fluídos que se tornam sítios potenciais para ocorrência de infecção (CHIDGEY e cols., 1997). Outras formas de pênfigo são conhecidas: pênfigo vegetante, descrito por Neumann em 1876 (*apud* THIVOLET, 1994); pênfigo

eritematoso, descrito por Senear e Usher em 1926 (*apud* HOLUBAR,1989); pênfigo herpetiforme, descrito por Jablonska e cols. em 1975 (*apud* HOLUBAR,1989); pênfigo neonatal; pênfigo induzido por drogas (THIVOLET, 1994) e pênfigo mediado por IgA.



**Figura 1.** Pacientes com pênfigo foliáceo



**Figura 2.** Pacientes com pênfigo vulgar.

Devido a maior ocorrência de PF na América do Sul e, sobretudo no Brasil, durante um certo tempo essa doença foi conhecida como pênfigo foliáceo sul-americano e pênfigo foliáceo brasileiro. A partir do final da década de 1980, a doença passa a ser chamada de pênfigo foliáceo endêmico. Essa designação reflete com mais precisão sua principal característica diferencial – a endemidade.

O FS é endêmico em certos estados do Brasil como Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde mais de 15.000 casos foram registrados até 1982 (DIAZ e cols., 1989a). O primeiro caso documentado de FS no Brasil foi citado por Aranha Campos. Ele descreveu dois casos de FS que apareceram no interior de São Paulo na região de Franca na segunda metade do século 19 (HANS-FILHO e cols., 1999).

Com o aumento significativo do número de casos de FS, pacientes não tinham onde serem hospitalizados. Foram construídos hospitais especializados que se dedicavam ao estudo e tratamento da doença, nos estados que apresentavam maior número de pacientes. O primeiro hospital, Hospital Adhemar de Barros em São Paulo (SP), seguido pelo Hospital do Pênfigo de Goiânia (GO) e o Hospital Adventista do Pênfigo em Campo Grande (MS) (LOMBARDI e cols., 1992), porém, atualmente há outras instituições habilitadas para o tratamento de pacientes com pênfigo.

A partir da segunda metade da década de 1970, ocorreu redução da endemia, que praticamente desapareceu em focos importantes, como São Paulo e norte do Paraná. Na região Centro-Oeste ocorreu estabilização em níveis bem menos significativos. Iniciou-se a fase de declínio da endemia e estabilização de focos que se estende até hoje. Assim, a história epidemiológica do FS mostra ascensão seguida de queda da endemia, que segue trajetória coincidente com o desbravamento e ocupação de regiões do território brasileiro (CAMPBELL e cols., 2001).

O pênfigo foliáceo ocorre em regiões com altitude entre 500 a 800 metros, sendo extremamente raro nas regiões abaixo de 400 metros ou acima de 1000 metros (LOMBARDI e cols., 1992). Foi observado que a forma endêmica acomete principalmente adultos jovens e crianças, de qualquer etnia ou sexo, que vivam ou trabalhem em áreas rurais endêmicas do Brasil e principalmente, próximo a rios. Essa doença é encontrada em menor frequência em outros países da América Latina (CAMPBELL e cols., 2001). Em algumas tribos indígenas, foi observada prevalência particularmente elevada (CERNA e cols, 1993).

## II.1b-Etiologia

Sua endemicidade tem gerado suspeitas de que algum fator ambiental esteja contribuindo para a patogênese da doença. As atenções se voltaram para a presença de mosquitos “borrachudos” nos focos da doença. Estes insetos antropofágicos, pertencentes a família Simuliidae, vêm promovendo discussões desde a década de 40, de que o fator desencadeante do pênfigo possa ser um vírus ou alguma substância salivar do animal, transmitida durante a picada (DIAZ e cols., 1989b; LOMBARDI e cols., 1992). Um levantamento realizado em 1998, caracterizou a distribuição de nove espécies de *Simulium* em regiões que possuem ou não focos da doença. Apenas a espécie *Simulium nigrimanum* apresenta habitat coincidente com as áreas endêmicas, estando em maior abundância quando comparado com as outras espécies residentes nessas mesmas áreas (EATON e cols., 1998).

Outros fatores exógenos, tais como fatores nutricionais e ambientais propriamente ditos podem estar contribuindo para a etiologia da doença. Foi proposto que o tiol, presente em alimentos e na água, poderia ser um dos fatores desencadeantes do pênfigo (BRENNER e WOLF, 1994 ; *apud* PAVONI, 2000). O tiol pode ser encontrado em alimentos tais como o alho, a cebola e o alho-poró. O fenol, presentes em alimentos como a manga, a castanha de caju, a mandioca e o guaraná, também foi apontado por TUR e BRENNER (1997, 1998) como candidato a contribuir para a indução do pênfigo (*apud* PAVONI, 2000). Análise da água consumida nas regiões endêmicas indicou a presença de taninos (polifenóis). Quando ocorrem cheias, o tanino das regiões ribeirinhas estaria sendo lixiviado. BRENNER (1999) propôs que a exposição combinada a todos esses agentes poderia estar influenciando na indução da doença (*apud* PAVONI, 2000).

Além dos fatores ambientais citados acima, vários outros fatores podem estar envolvidos na patogênese da doença. Nem todos os indivíduos de uma região endêmica desenvolvem o pênfigo foliáceo, sugerindo dessa maneira que a doença deve estar relacionada a uma combinação de fatores incomuns, que ainda podem estar ocorrendo em baixa frequência no meio. Assim, sugere-se a existência de fatores endógenos, inclusive genéticos. Sabe-se que o genótipo é importante na suscetibilidade à maioria das doenças autoimunes. No caso de pênfigo, verifica-se isso através da alta frequência de casos da doença entre indivíduos da mesma família que apresentem vínculo genético entre si.



O FS é uma doença autoimune órgão-específica, ainda de causa desconhecida, provocada por auto-anticorpos específicos para a epiderme, responsáveis pelo fenômeno de acantólise. No pênfigo foliáceo, a acantólise ocorre nas células epidérmicas mais superficiais (camada subcórnea), com o envolvimento raro de mucosas (COUNTER, 1959). A acantólise implica na dissolução ou lise das junções intercelulares do epitélio escamoso. As células epiteliais, sem as junções que as mantinham coesas umas às outras, perdem sua forma poliédrica, tornando-se arredondadas. O espaço formado entre as células resulta na formação de bolhas intraepidérmicas.

O soro de pacientes com pênfigo foliáceo contém auto-anticorpos da classe imunoglobulina G (IgG). Podem ser detectados no soro pela técnica da imunofluorescência indireta (IFI), e seus níveis correlacionam-se com a extensão e atividade da doença. Assim, o FS é a única doença das conhecidas atualmente que possui característica autoimune e, ao mesmo tempo, endêmica (CAMPBELL e cols., 2001).

Os auto-anticorpos do FS reagem contra uma glicoproteína de superfície, sintetizada pelos queratinócitos, denominada desmogleína 1. Esta é uma glicoproteína transmembrânica, com uma região intracelular e outra extracelular. Pertence à família das caderinas, tendo importante função no processo de adesão celular (CAMPBELL e cols., 2001). Indivíduos doentes perdem a tolerância a esse antígeno epidérmico.

Outro fenômeno tem mostrado fazer parte do processo acantolítico, que não seria necessariamente resultado de lesão induzida por anticorpos. O complexo antígeno-anticorpo induziria a liberação de uma enzima proteolítica (serina-protease) pelos queratinócitos. Esta enzima agiria como ativadora do plasminogênio, levando à produção de plasmina, responsável pela acantólise. Outras substâncias antigênicas que pudessem ser fatores desencadeantes desse processo continuam sendo alvo de investigações celular (CAMPBELL e cols., 2001).

Portanto, o pênfigo é um conjunto de doenças de caráter multifatorial, onde uma constelação de fatores, tanto endógenos quanto exógenos podem estar contribuindo para sua patogênese. Possui características autoimunes, onde há liberação de auto-anticorpos patogênicos com especificidade para moléculas componentes da epiderme e derme, promovendo dessa maneira o processo de acantólise, levando consequentemente à perda de adesão entre os queratinócitos e formação de bolhas.

## II.1c- Aspectos clínicos

As lesões cutâneas primárias são bolhas superficiais que se rompem facilmente. Essas podem encontrar-se transformadas em discretas erosões, escama fina e aderente ou em pequena crosta hemorrágica. É bastante comum o líquido da bolha conter bactérias que, com o rompimento e ressecamento, deixam escamas e crostas amareladas. As lesões iniciam-se de forma branda, pela cabeça, seguindo pelo pescoço, espalhando-se em seguida pelo corpo todo. Face e couro cabeludos são locais sempre acometidos no FS. Raramente o pênfigo foliáceo é agudo e fulminante (HANS-FILHO e cols., 1999).

Clinicamente, há três formas de pênfigo foliáceo: a forma localizada, a generalizada e a hiperpigmentada (DIAZ e cols., 1989a; HANS-FILHO e cols., 1999).

Pacientes que apresentam a forma localizada, possuem lesões, na maioria das vezes, limitadas às áreas seborréicas da pele. Essas lesões são vesículas e pequenas bolhas que se rompem rapidamente, deixando áreas erosivas secundárias e crostas, podendo também ser eritematosas, violáceas ou pápulas hiperpigmentadas. A maioria dos pacientes permanece com essas lesões estabilizadas. Alguns porém, podem apresentar disseminação das lesões para o tronco, abdômen e membros superiores e inferiores, evoluindo para a forma generalizada (CAMPBELL e cols., 2001).

A forma generalizada possui três tipos clínicos distintos. O primeiro é uma forma bolhosa-esfoliativa, e se manifesta em pacientes na fase aguda da doença. O segundo inclui pacientes que desenvolvem eritoderma esfoliativo. Já a terceira forma inclui pacientes que manifestam placas ceratóticas generalizadas e lesões nodulares.

Ao contrário das demais, a forma hiperpigmentada está associada à remissão da doença. Pode se restringir a áreas de lesões prévias, ou ser difusa. Antes do estabelecimento de tratamento com esteróides, essa característica era conhecida como aurora da cura, alterando a coloração da pele dos pacientes.

O diagnóstico deve ser feito através das características epidemiológicas conhecidas. A ausência de lesões orais possibilita a diferenciação entre FS e pênfigo vulgar. O exame histopatológico de lesões epidérmicas facilita o diagnóstico. A imunofluorescência indireta revela auto-anticorpos de FS em níveis distintos que podem ser associados com a atividade da doença.

A doença é tratada basicamente com glicocorticóides por via oral, sendo prednisona a droga mais comumente administrada aos pacientes. Em muitos casos, drogas imunossupressoras são administradas conjuntamente aos corticóides. A dose deve ir sendo reduzida a cada semana, a partir de indícios de melhoria clínica. Caso ocorra infecção bacteriana secundária, antibióticos sistêmicos devem ser administrados (HARMAN e BLACK, 1999; CAMPBELL e cols., 2001).

## **II.1d-Aspectos genéticos**

Através das características já descritas anteriormente, o pênfigo foliáceo pode ser classificado como uma doença de caráter multifatorial. Acredita-se que fatores genéticos, além dos ambientais, estejam contribuindo no desenvolvimento desta. O componente ambiental evidencia-se, principalmente, pelo caráter endêmico do PF. O genótipo possui importância na suscetibilidade à maioria das doenças autoimunes.

O componente genético pode ser verificado no PF, através da análise da frequência mais elevada dessa doença em indivíduos geneticamente relacionados do que entre indivíduos sem consanguinidade entre si. Em 1942, Aranha-Campos (*apud* MINELLI, 1986) estudou 604 pacientes dos quais 161 tinham mais de um membro afetado na família. Das 514 famílias, 443 tinham apenas um membro afetado, enquanto 71 apresentavam mais de um afetado. A maioria dos membros afetados de uma mesma família era geneticamente relacionada.

Uma vez que o risco para consangüíneos que compartilhem o mesmo ambiente que o paciente é muito inferior àqueles esperados para padrões simples de herança, acredita-se que vários genes estejam contribuindo para a suscetibilidade da doença.

O Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) apresentou forte associação com doenças autoimunes e, em particular, com o pênfigo, em diversos estudos realizados. PETZL-ERLER e SANTAMARIA (1989), demonstraram que dois dos genes envolvidos nessa suscetibilidade são HLA-DR e HLA-DQ, através de estudo realizado em uma população brasileira. Foram detectadas associações positivas entre pênfigo foliáceo e DR1 e DR4, e associações negativas com DR7 e DQ2. Concluíram que os haplótipos DR1,DQw1 e DR4,DQw2 são marcadores de suscetibilidade para FS, enquanto DR7,DQw2 e DR3,DQw2

são marcadores para resistência aumentada contra FS. Estes resultados mostram que a predisposição individual está sob o controle de genes MHC de classe II e que os pacientes com a doença tendem a compartilhar alelos HLA específicos.

MORAES e cols. (1991) detectaram uma associação positiva com DRB1\*0102 e uma associação negativa com DQB1\*0201 ao estudarem uma população brasileira com pênfigo foliáceo endêmico.

Através da análise de uma população indígena Xavante, CERNA e cols. (1993), encontraram associação positiva entre FS e DRB1\*0404. MORAES e cols. (1997), confirmaram essa associação com DRB1\*0404, através da análise de HLA-DRB1 em uma população de índios Terena. Aumentos não significativos de DRB1\*1402 e DRB1\*1406 também foram observados nesse estudo.

PAVONI e cols. (2003), encontraram associação positiva para os alelos DRB1\*0101, \*0102, \*0103, \*0404, \*0406, \*0410, \*1406 e \*1601, e associação negativa para DRB1\*0301, \*0701, \*0801, \*1101, \*1104 e \*1402.

Vários autores sugeriram que a suscetibilidade ao FS não é relacionada a um alelo particular ou a vários antígenos de histocompatibilidade, e sim a um epítipo presente em todos os alelos associados com FS, não tendo relação com a etnia (CAMPBELL e cols., 2001).

Como visto acima, vários estudos mostraram associações positivas e negativas entre variantes de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade e pênfigo foliáceo. Porém, essa doença possui caráter poligênico, e pouco se sabe sobre outros genes que possam estar envolvidos em sua patogênese. Essa busca inclui o estudo de genes candidatos, selecionados a partir de sua possível relação com os mecanismos efetores que desencadeiam o pênfigo foliáceo.

## **II.2-O LIGANTE DE FAS (FASL)**

### **II.2a-Introdução**

A eliminação de células indesejadas é vital para a embriogênese (formação de dedos, regressão dos dutos de Müller e Wolf) e período pós-embriônico, metamorfose (regressão da cauda de animais) e renovação tecidual, bem como para o desenvolvimento e funcionamento do sistema imune, agindo na regulação da resposta imune. A homeostase de um ser vivo está fortemente regulada não somente pela diferenciação e proliferação de células, mas também pela morte celular, que ocorre muitas vezes através da apoptose, uma forma de morte celular programada.

Podemos distinguir apoptose de necrose, pois esta é morfologicamente distinta da primeira, sendo uma forma patológica de morte celular onde o conteúdo intracelular é liberado no meio após o rompimento da membrana plasmática. É causada por agentes físicos, químicos e biológicos, tais como infecção viral, toxinas entre outros.

Na apoptose, ocorre a destruição ordenada da célula. Primeiro, há condensação do citoplasma, enquanto o núcleo, além de se condensar, tem o DNA fragmentado em pedaços menores chamados oligômeros. No estágio final desse processo, as células se fragmentam por inteiro, e seus produtos são empacotados formando os chamados “corpos apoptóticos”, que são rapidamente reconhecidos e fagocitados por células do sistema retículo endotelial (SIEGEL e cols., 1999).

### **II.2b-O gene *FASL* e seu produto gênico**

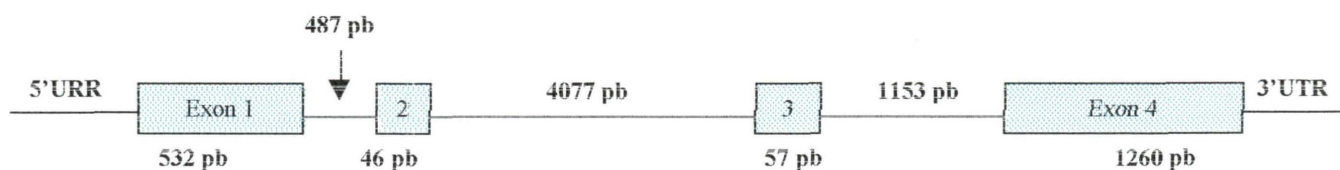
O gene que codifica o ligante de Fas, conhecido oficialmente pela sigla *TNFS6*, possui nomes alternativos tais como *FASL* e *CD95L*. É um membro da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), que desencadeia morte celular ao se ligar no receptor de membrana Fas. Seu produto gênico foi isolado primeiramente por SUDA e cols. (1993), a partir de um hibridoma de célula T citotóxica, utilizando uma estratégia de clonagem de expressão. É uma proteína de membrana do tipo II, possuindo cerca de 49 kDa (DE MARIA e cols., 1998).

TAKAHASHI e cols. (1994a) identificaram primeiramente o gene *fasl* murino através de retrocruzamentos interespecíficos, localizado na mesma região do cromossomo 1 que é

ocupada pelo gene cuja mutação é chamada *gld*, estando envolvida na doença linfoproliferativa generalizada por possuir a expressão de FasL deficiente. Mostraram que esplenócitos ativados de camundongos *gld* expressam RNA mensageiro para *fasl*. Entretanto o gene ligante de fas nestes murinos carrega uma mutação de ponto na região C-terminal, que quando expressa em células COS poderia não induzir apoptose em células expressando Fas (também conhecido como APO-1 ou CD95).

No mesmo ano TAKAHASHI e cols. (1994b) mapearam o gene *FASL* humano no cromossomo 1 (1q23), através da hibridização *in situ* com o uso de fluorescência. Este gene consiste de aproximadamente 8 kb estando dividido em 4 exons. O esquema de organização interna do gene pode ser visualizado na figura 3. O DNA complementar indicou que se tratava realmente de uma proteína de membrana do tipo II, constituída por 281 aminoácidos. Foi visto que 76,9% da sequência de aminoácidos possuía identidade com a proteína murina. Quando expresso em células COS, ambos os ligantes de Fas (murino e humano) induziram apoptose, indicando reação cruzada. Uma sequência de aproximadamente 300 pb que antecede o códon de iniciação ATG mostrou estar altamente conservada nessas duas espécies. Vários elementos reguladores de expressão foram reconhecidos nessa região.

Embora se acreditasse que sua expressão fosse restrita às células T ativadas, vários outros tipos celulares produzem e secretam essa molécula. FasL é constitutivamente expresso em neutrófilos, neurônios, tireócitos, células do estroma da retina, células acinares das glândulas salivares e células de Sertoli nos testículos (FRENCH e cols., 1997 *apud* DE MARIA e cols., 1998). Porém, uma variedade de tipos celulares podem expressar FasL em resposta a diferentes condições estimuladoras, incluindo macrófagos infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatócitos tratados com etanol, células leucêmicas sob ação de quimioterápicos além de outras células em transformação tumoral (FRENCH e cols., 1997; BADLEY e cols., 1997, *apud* DE MARIA e cols., 1998)



**Figura 3:** Organização interna do gene *FASL*



O ligante de Fas não é espécie-específico uma vez que a apoptose pode ser induzida em células humanas pelo FasL murino com mesma intensidade que o ligante humano agindo sobre células murinas (TAKAHASHI e cols., 1994b).

### **II.2c-Funções do sistema Fas/FasL**

Sem dúvida, uma das funções mais importantes desempenhada pelo ligante de Fas é a indução da apoptose. Fas e FasL são moléculas de superfície celular capazes de transduzir sinais apoptóticos em linfócitos T ativados, células tumorais, entre outras discutidas anteriormente (YONEHARA e cols., 1989; ITOH e cols., 1991) (figura 4).

A morte celular programada pode seguir duas vias diferentes. A primeira é através do complexo TNF/TNFR1 (receptor do TNF) e a outra é via sistema Fas/FasL, diferindo na cascata de eventos que levam a apoptose (figura 5). A via que utiliza Fas pode ser ativada quando ocorre a ligação deste receptor a anticorpos contra Fas, à moléculas do seu ligante (FasL) encontradas na forma livre ou ligada a membrana celular, e ainda a forma solúvel de Fas, encontrada sob a forma de um trímero. Este processo leva à agregação de Fas na membrana da célula e ao recrutamento específico de moléculas sinalizadoras intracelulares denominadas FAAD, que reconhecem o “domínio da morte” do receptor, promovendo assim ativação da caspase-8 necessária para a produção de caspases efetoras. Estas podem ter função de DNase, participando da degradação do DNA em oligômeros de 180 pb em média, ou função proteolítica, com destruição das proteínas citoplasmáticas, porém, a morte celular via Fas não requer necessariamente a degradação do DNA (SIEGEL e cols., 1999).

O sistema Fas tem mostrado papel fundamental na regulação da resposta imune e manutenção da tolerância ao próprio. Em linfócitos T, que expressam constitutivamente o receptor Fas, a função desempenhada pelo sistema depende do grau de ativação dessas células. Em linfócitos em repouso, a ativação celular em resposta a um antígeno leva a rápida secreção de FasL e aumento de citocinas, promovendo expansão clonal, migração e resposta imune efetora. Já a interação de uma célula apresentadora de antígeno (APC) com uma célula Th1, leva a expressão de FasL nesta, ao mesmo tempo que estimula um linfócito T pré-citotóxico (pré-CTL) via TCR. O ligante de Fas produzido pela célula T auxiliar age então sobre o

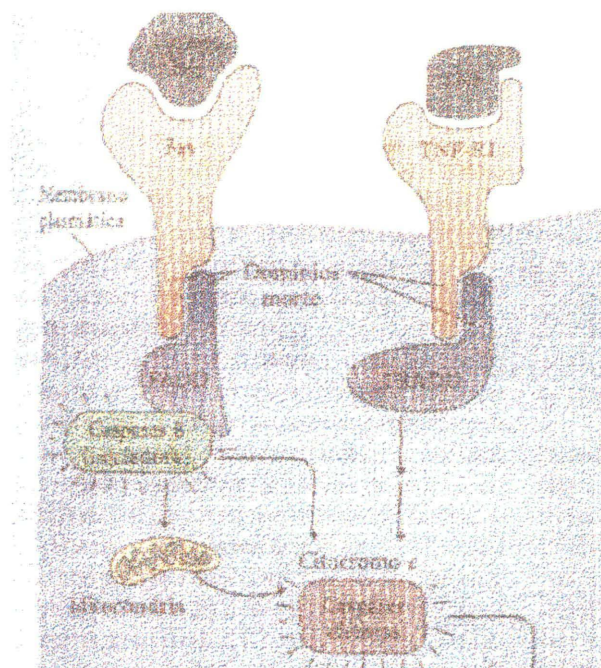
receptor expresso na superfície do linfócito pré-CTL, resultando assim, por co-estimulação, em um linfócito T citotóxico funcional (LYNCH e cols., 1995).



**Figura 4:** Célula T CD8 efetora agindo sobre célula-alvo infectada por vírus, através do peptídeo FAS e seu ligante, além de outras citocinas (PARHAM, 2001).

A indução da morte celular via Fas ocorre em estágios mais avançados da resposta imune, promovendo uma regulação negativa das células T, através da diminuição do número de clones destas. Porém, nem todos os linfócitos T são eliminados acreditando-se que como o nível de estimulação antigênica decresce com a eliminação de células-alvo, a expressão de FasL também é reduzida, reduzindo desta forma o processo de apoptose. Estas células “sobreviventes” talvez se tornem células de memória (LYNCH e cols., 1995).





**Figura 5.** Esquema de duas diferentes vias do processo de apoptose (Lenigher, 2000).

Apesar do sistema não estar envolvido no processo de seleção tímica, ele é um mecanismo de eliminação periférica de linfócitos autorreativos que escaparam desta. A eliminação de linfócitos B autorreativos na medula óssea também independe desse sistema, que pode agir na eliminação de células B ativadas na periferia (LYNCH e cols., 1995, DE MARIA e cols., 1998).

A destruição de células-alvo por linfócitos T citotóxicas se dá de duas maneiras. A primeira é a via que depende das perforinas (moléculas citotóxicas primárias), e o segundo é através do sistema Fas, através da ativação policlonal vista anteriormente. O reconhecimento da célula-alvo pelo linfócito leva a expressão de FasL neste, que irá agir no receptor Fas da célula a ser lisada, o que desencadeia a apoptose.

Um outro aspecto do sistema Fas/FasL é a formação de sítios imunologicamente privilegiados, principalmente através da eliminação de células T ativadas. Sem a presença dessas células, a aceitação de enxertos é maior, e por exemplo, a situação de risco de resposta

imune da mãe contra o feto na gravidez são evitadas (NAGATA e cols., 1995; HOLMES e cols., 1992).

Os testículos são considerados sítios imunologicamente privilegiados por aceitar tecidos alogênicos transplantados (NAGATA e cols., 1995). Enxertos testiculares de camundongos selvagens sobrevivem por longos períodos em receptores alogênicos, enquanto enxertos provenientes de camundongos *gld* (mutantes com expressão de FasL deficiente) não possuem o mesmo sucesso (BELLGRAU e cols., 1995). FasL é constitutivamente expresso nas células de Sertoli. Consequentemente, a expressão dessa molécula no testículo de roedores é capaz de induzir apoptose de células T ativadas. Estas últimas, por outro lado, são capazes de atacar e rejeitar enxertos. Baseado nessas descobertas, tem sido sugerido que a expressão de FasL pode ser utilizada no transplante tecidual e celular, procurando manter um microambiente imunologicamente privilegiado.

O RNA mensageiro de *FASL* é detectado no olho e sua proteína é expressa em células da córnea, íris, corpo ciliar e retina (GRIFFITH e cols., 1995). Dessa forma, a expressão de FasL em células da câmara anterior do olho é responsável por um ambiente imunologicamente privilegiado, devido à proteção da periferia ocular por linfócitos T ativados FasL<sup>+</sup>. Em camundongos, a expressão de FasL na córnea é um ponto culminante para a sobrevivência do enxerto após o transplante (STUART e cols., 1997).

Os aspectos imunológicos da gravidez ainda vem sendo desvendados. Do início ao fim da gestação, um feto semi-alógeno sobrevive em coexistência com células T maternas e sua potencial reatividade contra os antígenos de histocompatibilidade paternos (TAFURI e cols., 1995). Os mecanismos responsáveis pela proteção fetal contra o reconhecimento materno ainda vem sendo estudados para sua melhor compreensão. As células T maternas adquirem um estado transitório de tolerância aos aloantígenos paternos (TAFURI e cols., 1995). Estudos sugerem que a interface materno-fetal está protegida por um mecanismo mediador de lise celular contra a expressão de linfócitos e antígenos MHC de classe I e II no trofoblasto (HOLMES e cols., 1992; LE BOUTEILLER e cols., 1996a; LE BOUTEILLER e cols., 1996b).

FasL desenvolve papel na prevenção do intercâmbio de células imunes ativadas FasL<sup>+</sup> entre mãe e feto durante a gestação em camundongos. Tanto a proteína quanto o RNA mensageiro foram encontrados no útero e na placenta de todas as gestações observadas. A



expressão desse gene nesses tecidos pode estar associada à proteção da placenta ao fluxo massivo de leucócitos, estabelecendo um local imunologicamente privilegiado para o desenvolvimento fetal.

Em humanos, FasL tanto na sua forma ligada a membrana ou na sua forma solúvel pode induzir citólise de células que estejam expressando o antígeno Fas. A forma solúvel é responsável pela eliminação de células expressando Fas através de ação autócrina ou parácrina, enquanto a forma ligada a membrana necessita contato direto célula-célula para desencadear a citólise (MARIANI e cols., 1995 *apud* DE MARIA e cols., 1998). Outros estudos apontam para diferenças funcionais entre essas formas de expressão de FasL. A forma solúvel seria menos efetiva na indução da apoptose, sendo quimiotático para neutrófilos. Em contraste, a forma ligada à membrana teria somente funções apoptóticas (LAMHAMEDI e cols., 2001).

Ao contrário dos efeitos benéficos da expressão fisiológica de FasL, células tumorais expressando o ligante, podem invadir o sistema imune eliminando os linfócitos T ativados expressando Fas. Esse processo já foi visualizado em câncer de cólon uterino (O'CONNELL e cols., 1996). O efeito imunossupressor exercido pelo ligante de Fas em células tumorais pode ser um possível mecanismo pelo qual o tumor escape da rejeição imunológica e continue crescendo.

Em situações patológicas, cuja base genética é a expressão anormal de Fas ou de FasL, podem ocorrer reduções no limiar necessário para ativar a apoptose, ocasionando um suicídio celular excessivo. Essa predisposição para uma apoptose intensificada leva a liberação de nucleossomos e proteínas auto-antigênicas. Estudos em modelos animais experimentais revelaram que células apoptóticas podem ser antigênicas (BELL e cols., 1990; MOHAN e cols., 1993; ELKON e cols., 1997). A morte celular excessiva poderia não somente causar a deficiência de função de órgãos (produção de saliva e lágrimas, hormônios da tireóide, insulina, etc.) mas também uma auto-sensibilização generalizada dentro dos órgãos-alvo, resultando em maior destruição tecidual por um segundo ataque imune envolvendo linfócitos, produção de citocinas, fatores citotóxicos e perforinas (TAX e cols., 1995).

Estudos recentes mostraram a presença aumentada de FasL no soro de pacientes com pênfigo que não estão sob tratamento. Esta molécula estaria agindo sobre a superfície de queratinócitos expressando o receptor Fas, promovendo a apoptose dessas células através da

ativação da caspase-8. Este evento contribui para a perda de adesão célula-célula na epiderme, levando assim, à formação de bolhas características dessa patologia (PUVIANI e cols, 2003).

Altos níveis da forma solúvel de FasL foram detectados em soro de pacientes com necrólise epidérmica tóxica (TEN). Os queratinócitos produziram o ligante, induzindo a apoptose queratínica (VIARD e cols.1998).

Os achados acima nos mostram que o complexo Fas/FasL, desenvolve papéis benéficos e nocivos em situações patológicas, na biologia do sistema imune. A variabilidade genética dos genes *FAS* e *FASL*, juntamente com os níveis de expressão de seus produtos gênicos e a maneira como as células estimuladas irão responder a esses sinais, contribuirão para uma resposta imune fisiológica ou patológica. Estudos de associação a doenças envolvendo esses genes, poderiam contribuir para o melhor entendimento de vários mecanismos celulares. Entre eles a maneira pela qual células que estejam promovendo uma resposta imune alterada permanecem ativas, não sendo eliminadas pela morte celular programada (O'CONNELL e cols., 1996).

Portanto, o sistema Fas/FasL encontra-se envolvido em vários processos imunológicos. É responsável pela maturação de linfócitos na fase inicial da resposta a patógenos, ao mesmo tempo em que elimina células T ativadas durante a fase efetora, evitando assim uma resposta exacerbada com danos teciduais. Participa da destruição por apoptose de células-alvo e linfócitos T e B autorreativos na periferia. Promove ainda a formação de sítios imunologicamente privilegiados, através da supressão das células T ativadas, evitando uma resposta imune contra transplantes, na gravidez e outras situações patológicas, como por exemplo, o câncer.

## **II.2d- Variabilidade alélica de *FASL***

Algumas variantes alélicas já foram descritas para o gene *FASL*, em estudos populacionais e de associação a doenças.

WO e cols. (1996), descreveram uma deleção de 84 pb no exon 4, ao estudar o polimorfismo de *FASL* em 75 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico através da técnica de PCR-SSCP.



BOLSTAD e cols. (2000), encontraram dois polimorfismos em regiões não-codificadoras no gene *FASL*, através do estudo caso-controle para a síndrome de Sjögren. Percebeu-se uma mutação A→G no nucleotídeo 124 do intron 2 e uma deleção de timina no nucleotídeo 169 do intron 3.

NOLSOE e cols. (2002), realizaram um estudo de associação de variantes de *FASL* com diabetes mellitus tipo I. A tipagem do microssatélite 3'UT localizado no exon 4, podendo ter de 14 a 22 repetições GT, identificou 7 alelos diferentes. Dois novos polimorfismos (g-C-843T e g-A-475T) foram encontrados na região promotora. A variante na posição -843 da região promotora também foi analisada por STUCK e cols. (2003).

Essas variantes podem ser visualizadas na figura 6, que mostra a sequência nucleotídica do gene *FASL*. Os resultados desses estudos serão apresentados no próximo tópico, que aborda estudos de associação a doenças e variantes de *FASL*.

ZAYAS e cols. (2001), analisaram o polimorfismo das repetições CA de um microssatélite localizado aproximadamente 43 kb a montante da região promotora do gene *FASL*, em pacientes espanhóis e americanos com esclerose múltipla (EM). Foi possível caracterizar 2 alelos principais: 14 e 13 repetições CA. O microssatélite pode ser visualizado na figura 7.

**Figura 6:** Sequência nucleotídica do gene *FASL* e algumas variantes descritas

```

75841 tttgagacaa gcctgggcaa catagcaagt ccccatctgt acaaaaaaaaa aaaagaataa
75901 attagtcagg tgtagtgact tatgcctata atcccagcta ctcaggaggc caaggcaaga
75961 ggattgcttg agcccaggag tttgaggctg cagttaacta cgatagcacc actgcactcc
76021 agcctgggtg acagagtgag actctgtctc tatttaaata aataagtaaa taaataaact
76081 gggcaaacaa tgaaaatgaa aacattgcga aatacaaagc agctctgtgg gttccactgg
76141 tttgcagcct ctgatctaatt ttctaaagtg ggtgtagcag gtttttaacc tgtaaattat
76201 ggtgatcggc aggtcagggg aaatggtagt tgtgtgtggg gaagagatga tggcaacaga
76261 tgttttcctc ctgcaaaaac taaaatgtgg gagtgacttc tctggccatg actccatggt
76321 ctctcccctc agagccattt tcagtaaaat ttttatagtt taaaaaatac ggttctgaac
76381 aatttttggt agagttattt tgggattttt aaatagtttt ttgggtgtgt atatggtaga
76441 attcttaaaa ttatacaatt ataatgtata aaaaagcatg caattataat tcataaaatt
76501 atagccccac tgaccattct cctgtagctg ggagcagttc acactaacag ggctataccc
76561 ccatgctgac ctgctctgca ggatcccagg aaggtgagca tagcctacta acctgtttgg
76621 gtagcacagc gacagcaact gaggccttga aggctgttat cagaaaattg tgggcgga
76681 cttccagggg tttgctctga gcttcttgag gcttctcagc ttcagctgca aagtgagtgg
76741 gtgtttcttt gagaagcaga atcagagaga gagagataga gaaagagaaa gacagaggtg
76801 tttcccttag ctatggaaac tctataagag agatccagct tgccctctct tgagcagtca
76861 gcaacagggg cccgtccttg acacctcagc ctctacagga ctgagaagaa gtaaaaccgt
76921 ttgctggggc tggcctgact caccagctgc catgcagcag cccttcaatt acccatatcc

```

76981 ccagatctac tgggtggaca gcagtgccag ctctccctgg gcccctccag gcacagttct  
77041 tccctgtcca acctctgtgc ccagaaggcc tgggtcaaagg aggccaccac caccaccgcc  
77101 accgccacca ctaccacctc cgccgccgcc gccaccactg cctccactac cgctgccacc  
77161 cctgaagaag agaggggaacc acagcacagg cctgtgtctc cttgtgatgt ttttcatggt  
77221 tctggttgcc ttggtaggat tgggcctggg gatgtttcag ctcttccacc tacagaagga  
77281 gctggcagaa ctccgagagg taagcctgcc ggcagactgc tgtgccctgg aggcaccagg  
77341 cataagggga tggagggccc actgcctggc ttgcaaagtg cttttcaatc cttttttttt  
77401 ttttcttaga aatgggttgt tctagttatt ctattctata gacagagaaa tggaggctca  
77461 taggggtgaa gggaatatatt tttactttgt aaagaatcag agcccaacag tttgtctttc  
77521 ctcagttgtc aactcagttc gttgaaccac ttactgcctc atacctattg atttaaggag  
77581 taaaaaacia acaaaacaaa cttttaagtt ttgcttggaa gtaaatttgt tcagatgacc  
77641 aaactaaatc ttgaaaattg gtacgattcc aaatcacaaa actgaggggac agtgaggcaa  
77701 aattgcttgg ccaaagccca agtttagcaga acttctgagg tatttggatt ctctttccag  
77761 ggcttggttt atttgacgat tctgcctctt ttgcttaaaag aattttatatt ttattatata  
77821 tcttttctct ttctgtttta ctagtctacc agccagatgc acacagcatc atctttggag  
77881 aagcaaatag gtgagttctt tttcgcatgt acattgagtt cccaaagatg atcctcagca  
77941 cagaactatg ttaatggaat gccttaaatt ctgtcccaca ctttgggttc tgtacactat  
78001 aagaggaatt ctggctaatt cagaatctct ggtctatgat tccttgagct gctttaaaaa  
78061 tgtgaagtga attgaattgc tcacaatcaa tatagctgag cactgcacac aattcaaaat  
78121 cacttccact tgactttgga aagagacaca catatacaac cctggacctt tgcccctga  
78181 gaagtggctc caggcctgtc cccttccaca gacatcctgg tctgggcaca cacgccagtg  
78241 gctgtaactc ctgggaagag aaggcgaaat gaaggcagag acagatgttt ctgagaaacg  
78301 tcctttcctc ttttaaattgc cctaaagaga ttacattgaa gctttattta caatatgttt  
78361 tataggatgt aagcttttaa aacatggata atcaattccc cacattagaa tgggttttct  
78421 tgaagtactc gagaagctta agggaagact tcagccatca ttcaaaggat gttcagcttc  
78481 acccacagag gcagtcatga ggtacccttg atcacaaagg aaaatccttt gtatgggagc  
78541 tagggcaaga agatgatagg ttgaacactg atctcatgaa atttcagggc atagttgtgc  
78601 aagctctgta cagatagatt ttacagtgtg cttcactagt ctaagattca ttgaaatatt  
78661 agatttagat ttacaatgag attcattgaa ttttttagagg tggaagggaag cttagaatat  
78721 atctagtcca gccatttcat tttttggaag agaaacaaaa taccagatgg attaggtgaa  
78781 tatgcccaag accactggta tgccattggg gctagaagga acacaggctc ttgatgcctt  
78841 gtcacctaca gggctttcca gtactggact ggtgcctcat gaaggaggga aactcctgtc  
78901 tctctgtagt gagcatggaa taagaaatag atgaaaagca ggatacctct gcaaagacta  
78961 taggtagatc tcattccttag aaactcagaa taaagaagaa ggcagcactg gccatctatt  
79021 aagtgaagca agttccagtt tctccggatg tggctactgc acatgacca gtcgcctgtc  
79081 tactatccta gactgttaag ttcttatatg agccactgtt gggatgctct ggccctgct  
79141 tctgtgtcct aatccttaaa tgttagaaag tccatatgta cacaagcaga gtggaaatat  
79201 ttgatagaaa agtaaagcct ctggaggagc tctgaaataa gatcttttg caccactct  
79261 gaatgtgcct ggtctgatag gtatctaatt attcatcttt caccactct ctggagtcaa  
79321 tttagtgatt aaaagtcaaa tgatcagggt agtcagatcc atctacccca gtaagcaatt  
79381 atgttctcta gatcaacca aataaaccag aaattggtaa atcatcacat ggaaatcaaa  
79441 tcagtaactt tactaataag aaaagagatg caaattaaaa atagggaata ccaattttca  
79501 tcaaattaat aaagattaaa aaaaaaccca gactgacaaa gatttgagag aaaagtgcct  
79561 gtgcaaacat tagtttcagc cagtatacat gtaaattgct ataacttttt ttgaagagcg  
79621 ctttagaaat acatagcaaa agcttghtaac tagtagttta cgttghtaat ctatcgctaa  
79681 gaatttatct taagaaaata atcagagatg tgcccgaaga tttatatata aggatgttca  
79741 ttacttcctt atgagcctat ttataataaa taattcagaa gaaacttgaa tgcctcatac  
79801 gagattagtt atatacatta tgggtgtattc agacaagcac ataataagca gcaactaaaa  
79861 gtgatgtatc agaaggacat ttaatgcctt ggggattgtg cactctgtat tgttagataa  
79921 aaagacaagt tacaagaggg tatgttttagt ttcatactga ctatgtaacc atgtatgcac  
79981 atttttatat tcttaggaac tggaaagtgt tacacactga catactaaca gtgattttct



80041	ctgggagata	ctattataga	ttattttatac	tttctaattt	gctccttttt	acattttcca
80101	tttttttccg	gttaactaat	taaatctttt	attcattcac	atgtgtgagg	ctagatgttg
80161	ggtgttgat	gctgattgag	gatgagccag	cccagggggc	ctgtccttat	ggagctttta
80221	gcagggggaa	gaagctaaac	aaaagcaagc	aaacagacca	tgcaattcca	aagttgtact
80281	aagtacaacc	tgagaatctt	ctttaaggag	gtgttggtta	cgctaacacc	ttgggggtca
80341	gaagcccgat	gagtgaacgg	ctgtgtgcat	gtgctgtgga	gtgggggtggg	gctggggggc
80401	ggcatttcag	cgctgggaac	ggcacatgca	aaaaccctgg	ggcaggaagc	actcataacc
80461	agtgtctagg	atatccttgc	aattttattta	ttccagtata	ggtacagcag	atattcttag
80521	tgagcatgtt	ctgtaagaat	aacgttgtag	taggctctgt	gagggatata	aagacatgca
80581	acatgtgggt	ctctgttccg	tttcctgccc	gtgctgtggc	gagtgccaga	ttagttgtct
80641	gggtgggttg	cggtgtagga	atgcagagga	gactcagttt	tgcttttctt	gttcgctaac
80701	acctcctaca	tgggtgggttg	tcttggtatga	ctagagaggt	catgattgct	cagctaattgt
80761	tctctgtgga	ttggggccatt	ctcataccat	atgtgagttt	tacaggctaa	tcacgaacct
80821	gacatagaca	agcatctcct	gtgaatatatt	attgaagtct	cagttagctg	aattcattag
80881	ctaagtggca	gctgtctatc	ttgtctgaaa	cagttgaagt	cagagaaata	gtgtctgttt
80941	tgagaactat	tgtctatcct	tccattttaat	ttgtccaaca	tttgctagta	acatgccctg
81001	tgttagaaac	tgggcttctc	tgggtgaactc	aacgtatcgt	aaggaacttg	tcgttatttg
81061	aggggaataa	gataatttat	gtagttaccc	cagagacaag	aggagtcaga	aatgacaaga
81121	gaggggaaga	cagagggatc	ctagatttca	aaagaggggc	agatcatatt	tgatcaaaaa
81181	aggcttgaga	gggtttccca	aagaaagcgg	taataggtag	tccttatggg	atgttttagga
81241	atttgacaca	gaaatctgct	tgaaagaaca	ttacgggcag	aagacatggc	atgaacaaag
81301	gcacagagga	aggaaagtgg	gggtatgtgt	aggccacaga	actcccgttg	tgtggcaatg
81361	ctcagtggga	gtaaggagat	aaggctggac	agatgggctg	ggatttgtgtg	atggggatag
81421	ttgtatacga	cggcatcttc	ggggaggagc	aattaaaggt	gtttgaggac	tcagtgatat
81481	gaggtgattg	tcagaggtct	taagataatt	aatttggggc	agattgtaaa	atgtcactgg
81541	gggaagatct	ggtgacacgc	agacagatca	gtagtcttct	tcagcctctg	tcctgtaagt
81601	cttttgaaca	agagaatcag	agtggacaga	gccctggaat	tggcgtcagg	agagcagggg
81661	gtggtcccat	ctgtgatgct	gactagctgg	gtcttcttgg	attagtcacc	caacttctaa
81721	gctcattttg	caatcgataa	ggtgggacaa	taatacctac	ctcaaagggg	tgtggtgagt
81781	tctaaatgca	ataactgaca	tgacagctct	ttatgaataa	atgtttatat	taattatgtt
81841	ttattgtaac	attataattt	atacatatgt	caatcttaat	ttggtttatt	tttttacctc
81901	tttgtttctg	aaatatagac	tactatgaat	cctgcagttc	agacctacat	gatttagtata
81961	tgtagactg	ttgccattta	cggtttttaa	atcttttttt	taaaatgatt	ggattttaaat
82021	tcccaccaa	ataatagtgt	ctatttcatt	ttaacatata	tttttctctt	ctctatgata
82081	caggccaccc	cagtcacccc	cctgaaaaaa	aggagctgag	gaaagtggcc	catttaacag
82141	gtctgtatct	ggaaggatca	ggtgagattt	gggaaagcct	ttggcaaaaag	gcaaaatggc
82201	tgccctggtt	ccattaccag	gctctagaga	gttggttact	cctggagaca	gtattttgaac
82261	ccaataatac	taacactttt	cttgctcagat	cagtcttatg	aacacacttt	gatccccat
82321	tctctgggca	aggccctctt	ctaaattgga	gacctggagc	tgattatgac	atgaccctctg
82381	cccataagaa	gctcattctt	ttcagtcatt	ccaaagtccc	ttgggggatt	gggggcacag
82441	atccaagagg	tgagagatga	gaaggtgagg	aatgaggact	tatttttagtc	agtgccttct
82501	tggttttctg	gaagagcttc	actctgcttt	gtccaagagt	ataaatagga	gtgagaaggg
82561	agactcaatc	ctggcacttg	tagagtttca	atatgtgcct	gtaaagtgga	gtgaaatgat
82621	atggtatggg	cactcccatt	ataaactaca	taaataatgg	aataaatatc	acagaaagtg
82681	gtaggctatt	gtccctggaa	ttatttaggc	agaaattata	gaatgatccg	gtcacatcag
82741	cagacactta	ctgaatacct	gctgtgtgcc	aatttgggga	tgtgaagatg	agtagcacat
82801	ggctcttgcc	cccagggagc	ttgacatcta	atagggaaaag	acaggcactt	atgataattt
82861	cagtacttca	gagatttagg	ttatgttcat	gatgttggtg	ggatacaaag	aaaagggaac
82921	tgtaccccaa	attgaggggg	tgaataattc	ttactgcagg	tgagaagatg	gaccagatgg
82981	tccctaagat	ccttcccaac	tttagaactt	tagagttcct	tggatttggc	tttttcttct
83041	aggaaaggac	ttcaaagcct	agcagatttg	gtgctagttc	tgaagatagt	aaaatctttg

```

83101 ttccagagag caaatat tttt ctcaataatt tcttactgca atggattacg ggtatatact
83161 attgttccaa ttgtgtggat gacaaaatag gacaacgttg ttgaggaaat tctgtgatgg
83221 atcaagttct gacccctcag ccagttctat accagctgtc attctgggtg aaacatttgt
83281 tgaaggaagg gcccacagtt ttgccttaga aacttagttt gttggatgca tgactattcc
83341 ttgttgaaag ctcccttttg atttatttca ggcaagtcca actcaaggtc catgcctctg
83401 gaatgggaag acacctatgg aattgtcctg ctttctggag tgaagtataa gaaggggtggc
83461 cttgtgatca atgaaactgg gctgtacttt gtatattcca aagtatactt ccgggggtcaa
83521 tcttgcaaca acctgcccct gagccacaag gtctacatga ggaactctaa gtatccccag
83581 gatctggtga tgatggaggg gaagatgatg agctactgca ctactgggca gatgtgggcc
83641 cgcagcagct acctgggggc agtggtcaat cttaccagtq ctgatcattt atatgtcaac
83701 gtatctgagc tctctctggg caattttgag gaatctcaga cgtttttcgg cttatataag
83761 ctctaagaga agcacttttg gattctttcc attatgattc tttgttacag gcaccgagaa
83821 tggtgtattc agtgagggtc ttcttacctg ctttgagggt caagtaagaa gacatgaacc
83881 aagtggacct tgagaccaca gggttcaaaa tgtctgtagc tctcaactc acctaattgtt
83941 tatgagccag acaaatggag gaatatgacg gaagaacata gaactctggg ctgccatgtg
84001 aagagggaga agcatgaaaa agcagctacc aggtgttcta cactcatctt agtgcttgag
84061 agtatttagg cagattgaaa aggacacctt ttaactcacc tctcaagggtg ggccttgcta
84121 cctcaagggg gactgtcttt cagatacatg gttgtgacct gaggatttaa gggatggaaa
84181 aggaagacta gaggcttgca taataagcta aagaggctga aagaggccaa tgccccactg
84241 gcagcatctt cacttctaaa tgcatactct gagccatcgg tgaaactaac agataagcaa
84301 gagagatgtt ttggggactc atttcattcc taacacagca tgtgtatttc cagtgaatt
84361 gttaggggtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat gactaaagag agaatgtaga
84421 tattgtgaag tacatattag gaaaatatgg gttgcatttg gtcaagattt tgaatgcttc
84481 ctgacaatca actctaatag tgcttaaaaa tcattgattg tcagctacta atgatgtttt
84541 cctataatat aataaatatt tatgtagatg tgcatttttg tgaaatgaaa acatgtaata
84601 aaaagtatat gttaggatac aaataatttt tagaatttac taatatttga attttttgcct
84661 tattattttct ttccctccttg atttcttcat tcattatgat atcagaccac ttttaagaat
84721 aatttactgg agtgagaaga actatgaatc aaatctttct gcctttgcta ggccttcctt
84781 ctctctatat attctctttc ctcttcacct cccagagttt ccattaccaa tattatgacc
84841 aatgttaagc ttagccaact ttccatagat ttgatgagaa attatatttt cctgaaggca
84901 gaaccatggc acagtggaaa gggcacatat tttggactaa aaaacttaga tttgaatctt
84961 tgttcttcca cgtactgcct atgtaagcac tggttagggt acttgacctt ccttgaacaa
85021 aaaaagagct gaaagtatca gacacataga acatcaaaaa atagtgtctg ccactactaa
85081 gccactctat tagagccact tcattctcca gaggccactg atctgtggga tccatctaag
85141 cacctggttt cttgtattct catgcttgct attcacaacg gccttttccct attttcttca
85201 accactcact atcatgggct ctccctagac tttgttatca ttaaaaatta tagtaactcc
85261 tttggaattt gatttttaggt gtcttatttt cacaacatca tcttctatta

```

#### Legenda:

Em vermelho, sequência correspondente ao exon 1.

Em azul, sequência correspondente ao exon 2.

Em verde, sequência correspondente ao exon 3.

Em rosa, sequência correspondente ao exon 1.

Em **negrito**, deleção descrita por WO e cols.(1996).

Em **negrito**, a mutação 124 A/G, descrita por BOLSTAD e cols. (2000).

Em **negrito**, a deleção 169 T, descrita por BOLSTAD e cols. (2000).

Em **negrito**, o microssatélite GT 3'UT descrito por NOLSOE e cols. (2002).

Em **negrito**, o polimorfismo -843 C/T, descrito por NOLSOE e cols. (2002).

Em **negrito**, o polimorfismo -475 A/T, descrito por NOLSOE e cols. (2002).



**Figura 7:** Microsatélite *FASL* a montante da região promotora.

```

30121  caggggatca  tttgagggagt  tcgagaccag  cctgaccaac  atgggtgaaaa  cccgtctctta
30181  ataaaaatta  aaaaaaagta  gccgggcatg  gtagcacatg  cctgtagtcc  cagctactca
30241  ggaggctgag  gcaggagaat  tgcttgaacc  tgggaggcag  acaggttgca  gtgagctgag
30301  attgcaccac  tgcactccag  cctgggtggc  agagtgagac  tgtctcaaaa  aaaaaaagtt
30361  atgcatacat  ataatttgat  aaattagttt  tataaggctt  ataaagtaag  aacagaaaac
30421  agttctctat  tctgtaccat  ttcactcaca  cacaacgcac  acacacacac  acacacacac
30481  taccagtacc  acccatcttt  ctctaccaa  gatttcttgc  ttcccagtg  caaacatttt
30541  ttattccgtc  tgcagttatt  gtgcttccct  taccttgctg  cttatttttc  cattttttaga
30601  tgtgtcctca  gtttgaaat  acaaacttgt  acgcatgaac  atgagataga  tataaactta
30661  tattggttaa  tgtaattgga  taagtctatt  caaaatcaca  caacaggaca  acttagaagt
30721  actgcttttc  ttcaactgat  tgatttaaaa  aatttcaaat  ctgtagataa  gttgaacacc
30781  atgtgccttt  gccagattc  accagttgct  aatcttttta  gttttcttca  tgtgtatgtg
30841  ttttatatgt  atatgtgtat  tatatgtata  tatgtatgta  taaagatatg  tatgtgtgtt
30901  atgtgtatat  atataaagaa  acatcttttg  gtgagccatt  tgtaagcaag

```

## II.2e- Estudos de associação a doenças

Estudos recentes revelaram o papel do complexo Fas/FasL em doenças autoimunes, inclusive inflamatórias, sendo mediadores da destruição tecidual (CHERVONSKY e cols., 1997; GILKESON e cols., 1997; ITOH e cols., 1997 *apud* SAKATA e cols., 1998).

A tiroidite de Hashimoto (TH) é caracterizada por uma destruição inflamatória crônica da glândula tireóide. Estudos demonstraram que a apoptose desempenha um papel importante nessa doença (TANIMOTO e cols., 1995 *apud* SAKATA e cols., 1998). O ligante de Fas é constitutivamente expresso em tirócitos normais, porém o antígeno Fas está presente apenas em condições patológicas (GIORDANO e cols., 1997 *apud* SAKATA e cols., 1998). Assim, este antígeno mostra ser um mediador potencial do suicídio celular ao interagir com FasL, levando a destruição contínua da tireóide. O contrário parece acontecer na doença de Graves (DG), onde moléculas anti-apoptóticas parecem proteger estas células da ação do ligante de Fas, promovendo o crescimento demasiado da tireóide. STUCK e cols. (2003) estudaram a variante -843T/C do gene *FASL* em 176 famílias de origem caucasóides com DG e TH, totalizando 625 indivíduos. As frequências alélicas encontradas para descendentes de pacientes com HT foram T= 37,1% e C= 62,9%. Já em descendentes de pacientes para DG as frequências encontradas foram: T= 39,5% e C= 60,5%.

Em humanos, a síndrome linfoproliferativa é uma doença de caráter monogênico, causada por mutações no genes *FASL*. WU e cols. (1996), analisaram mutações no domínio

extracelular de FasL. Uma anormalidade em heterozigose foi descoberta em um paciente que apresentava linfadenopatia. Clonagem molecular e seqüenciamento indicaram que este paciente possuía uma deleção de 84 pb dentro do exon 4 de *FASL*, resultando em uma deleção de um fragmento de 28 aminoácidos.

A patogênese do lúpus eritematoso sistêmico (LES) é caracterizada como sendo multifatorial e poligênica. Os genes indutores de apoptose (*FAS* e *FASL*) são candidatos a contribuírem para essa doença, pois mutações de ambos resultaram em autoimunidade em vários modelos murinos para LES. Alguns dos distúrbios causados por muitos genes apresentam padrões de herança monogênico, como visto na síndrome linfoproliferativa. No caso do LES, que é um distúrbio poligênico, os genes *FAS* e *FASL* podem estar contribuindo para seu desenvolvimento, através da interação com outros genes e fatores exógenos.

A diabetes mellitus tipo I (insulino-dependente) é resultado da destruição de células pancreáticas do tipo beta, através de uma reação imune regulada por linfócitos T e macrófagos. Modelos murinos mostraram indícios que esta destruição celular ocorre por apoptose (DELANEY e cols., 1997; O'BRIEN e cols., 1997). Há evidências que FasL, indutor de apoptose através de células T, pode estar envolvido na patogênese dessa doença, provavelmente porque mediando a apoptose, manteria tolerância própria periférica além da regulação secundária da resposta imune. Estudo do polimorfismo de variantes de *FASL* (promotor, exons 1-4, e microssatélite GT na região 3'UT) em famílias dinamarquesas não mostrou evidências de associação com diabetes mellitus tipo I. As repetições 16 e 17 do microssatélite em questão foram mais freqüentemente observadas com freqüências de 79,5% e 18,0%, respectivamente. Portanto, *FASL* não contribui para a suscetibilidade genética dessa doença (NOLSOE e cols., 2002).

Um déficit funcional do FasL em mediar mecanismos apoptóticos tem sido encontrado em pacientes com esclerose múltipla (EM). Dessa maneira, uma falha determinada geneticamente na indução da morte em células T (AICD) pode ser conduzida por uma expressão alterada de FasL. A análise do polimorfismo de um microssatélite CA, localizado a montante da região promotora, em pacientes espanhóis e americanos que manifestavam esclerose múltipla revelou uma associação entre o alelo de 13 repetições e o haplótipo HLA-DRB\*11501-HLA-DQB\*0602. Os resultados do estudo indicam que o alelo correspondente a

13 repetições confere proteção à EM, particularmente na sua forma familiar (ZAYAS e cols., 2001).

Portanto, o complexo Fas/FasL encontra-se envolvido na patogênese de muitas doenças autoimunes. A análise do polimorfismo de várias posições do gene *FASL* pode contribuir para a investigação dos níveis de expressão do ligante, bem como inferir variações na sua estrutura molecular que possam estar contribuindo para a patogênese da doença. Estudos já demonstraram associação desse polimorfismo com algumas doenças, como por exemplo, o microssatélite de 13 repetições na esclerose múltipla. Já outras posições analisadas revelaram ausência de associação com diabetes mellitus tipo I.



### III-OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

O presente trabalho tem como objetivo a investigação de possíveis associações entre variantes do gene *FASL*, com o pênfigo foliáceo, através de análise de associação caso-controle. Dessa forma, procura-se verificar se variantes de *FASL* encontram-se significativamente diferentes entre o grupo de pacientes e controles. Além dessa análise caso-controle, as frequências alélicas populacionais para este gene também serão determinadas, uma vez que poucas populações foram caracterizadas quanto ao polimorfismo de *FASL*.

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- Desenvolvimento de metodologias de tipagem para variantes de *FASL*.
- Estimativa de frequências de indivíduos portadores dos alelos, de frequências alélicas e frequências genotípicas.
- Comparação entre pacientes e controles através da análise de frequências de indivíduos portadores dos alelos e frequências alélicas, buscando verificar possíveis associações.

O pênfigo foliáceo é uma doença autoimune complexa. Fatores genéticos e ambientais estão envolvidos em sua etiologia, e, juntamente com outras variáveis endógenas e exógenas, tornam o pênfigo uma doença de caráter multifatorial. A elucidação de fatores genéticos que possam estar associados a esta doença contribuirá para que sua patogênese seja melhor compreendida, na busca de procedimentos que possam minimizar seus efeitos.

## **IV-MATERIAIS E MÉTODOS**

### **IV.1-AMOSTRA POPULACIONAL**

Foram analisados 392 indivíduos, sendo desses 187 pacientes e 205 indivíduos-controle.

As amostras utilizadas nesse estudo foram obtidas em anos e locais diferentes, totalizando seis coletas, no período de 1987 a julho de 2002.

A primeira coleta das amostras de pacientes foi feita no Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque de Piraquara (Piraquara/PR) em 1987 (n=16). As demais amostras de pacientes foram coletadas nos anos de 1997 e 1998, no Hospital Adventista do Pênfigo .

Entre 1997 e 1998, também foram feitas coletas no Hospital Adventista do Pênfigo (n=273).

Em julho de 2001 e julho de 2002, foram realizadas novas coletas de amostras tanto de pacientes como de indivíduos-controle no Hospital Adventista do Pênfigo (n=103) .

### **IV.2- METODOLOGIA**

#### **IV.2a-Extração de DNA**

O DNA das primeiras amostras coletadas foi extraído anteriormente no próprio laboratório. Para as amostras coletadas no Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque de Piraquara (num total de 12 amostras), o DNA foi obtido pelo método de extração por fenol/clorofórmio (SAMBROOK e cols., 1989). O DNA das demais amostras coletadas no período de 1987 a 1998 foi obtido utilizando-se o método de *salting-out* (baseado em LAHIRI e NURNBERGER, 1991), e ajustando-se a concentração para 20µg/ml .

O DNA das amostras das últimas duas coletas foi extraído seguindo novamente o protocolo de SAMBROOK e cols., 1989.

#### IV.2b-Tipagem do gene *FASL*

O segmento que inclui a variação de ponto C→T localizada na posição -843 da região promotora do gene *FASL* foi amplificado e tipado pela técnica de PCR-SSP (reação de polimerização em cadeia – amplificação sequência específica). A PCR consiste em sucessivos ciclos de desnaturação da molécula de DNA, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) e extensão das cadeias de DNA mediante a ação da enzima DNA polimerase. Esta técnica empregou dois oligonucleotídeos 5', o primeiro específico para o alelo T (FasL843Fw1) e o segundo específico para o alelo C (FasL843Fr2). Um oligonucleotídeo (FasL843Rev) comum as duas variantes foi utilizado na extremidade 3' (NOLSOE e cols., 2002). A sequência dos oligonucleotídeos utilizados pode ser vista a seguir e as condições para a amplificação do segmento gênico podem ser vistas na tabela 1. As condições de ciclagem estão descritas na tabela 2.

**FasL843Fw1:** AATGAAAATGAAAACATTGT

**FasL843Fr2:** TAAATAAGTAAATAAATAAACTGGGCAAACCTTGAAAATGAA  
AACAACGC

**FasL843Rev:** CCCACTTTAGAAATTAGATC

**Tabela 1.** Condições utilizadas para a amplificação do gene *FASL*

REAGENTE	CONCENTRAÇÃO
Tampão Biotools sem MgCl <sub>2</sub>	1x
DNTP	0,2mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5mM
FasL843Fw1	16µM
FasL843Fr2	16µM
FasL843ver	16µM
TTh polimerase	0,8U
DNA	0,2µg
Água mili-Q q.s.p.	20µl

**Tabela 2.** Condições de Ciclagem\*

ETAPA	CONDIÇÃO
<b>Desnaturação inicial</b>	94°C – 5 min.
<b>Desnaturação por ciclo</b>	94°C – 45 s
	47°C – 45 s – 5 ciclos
<b>Anelamento (step-down)</b>	45°C – 45 s – 10 ciclos
	42°C – 45 s – 20 ciclos
<b>Alongamento por ciclo</b>	60°C – 15 s
	72°C – 45 s
<b>Alongamento final</b>	72°C – 10 min.

\* Termociclador: PTC-200 (MJ Research)

Após a amplificação do segmento gênico, 10µl produto de PCR, juntamente com 3µl de solução de corante azul de bromofenol (0,25% de azul de bromofenol, 40% p/v de sucrose em água bidestilada), foi submetido a uma corrida eletroforética em gel de agarose 3%, a uma voltagem de 100 V por 1 hora. Posteriormente, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo (0,5 mg/ml) e observado à luz ultravioleta.

Para melhor confirmação de genótipo, uma parte dos produtos amplificados foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% não-desnaturante (acrilamida / bisacrilamida 29:1, 5% glicerol e tampão TBE 0,5% para o volume desejado). A polimerização foi feita adicionando 30µl de persulfato de amônio 10% 30µl de TEMED. Uma quantidade de 10µl do produto de PCR foi aplicado no gel juntamente com 6µl do corante utilizado na eletroforese em gel de agarose. Cada placa foi submetida a uma corrida eletroforética de 20 mA, por aproximadamente 4 horas.

A coloração foi feita posteriormente, com nitrato de prata. O gel foi retirado da placa e tratado com HNO<sub>3</sub> 1%, durante 3 minutos, para a retirada do corante. Após lavagem 2 vezes com água destilada, o gel foi agitado em solução de AgNO<sub>3</sub> 0,2% durante 20 minutos. Mais duas lavagens com água destilada foram feitas preparando o gel para a revelação. Esta foi feita com 170 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 92µl de formaldeído. A reação foi cortada com a solução de ácido acético 10% durante 5 minutos. Após lavagem com água destilada, o gel revelado foi embebido em solução de glicerol 5% e selado em sacos plásticos para posterior análise.



#### IV.2c-Análise dos dados

Os resultados provenientes das tipagens de todos os indivíduos foram submetidos ao programa CONVERT 1.1 (PROBST, 1998), que calcula as frequências genotípicas e cria arquivos de entrada de dados para a posterior utilização pelo pacote de programas ARLEQUIN v.2000 (SCHEIDER e cols., 2000). Com auxílio deste, foram obtidas por contagem direta, as frequências alélicas ao alelos C e T da posição -843 do gene *FASL*. As frequências genotípicas obtidas nas tipagens foram comparadas com as esperadas segundo o teorema de Hardy e Weinberg, através do método de GUO e THOMPSON (1992).

As diferenças de frequências de algum fator entre pacientes e controles serão testadas estatisticamente através do teste exato de Fisher, pelo algoritmo metropolis, utilizando o programa RXC (MILLER, 1997). Diferenças estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) indicam presença de associação. Detectada essa significância, foi realizado o cálculo de OR (“odds ratio”) que dará a razão da probabilidade. Esta análise é dada a partir da fórmula:  $OR = (A \times D) / (B \times C)$  (WOOLF, 1995), sendo os valores A,B,C e D obtidos através da seguinte tabela:

	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado	<b>A</b>	<b>B</b>
Negativo para o fator pesquisado	<b>C</b>	<b>D</b>

O resultado dessa OR, para doenças raras, se aproxima do valor de risco relativo (RR), que exprime quantas vezes a doença é mais frequente entre os portadores de um determinado fator, comparando indivíduos sem o fator (SVEJGAARD e cols., 1974). Valores de OR iguais a 1 significam ausência de associação do fator analisado com a doença em questão. Já valores acima de 1 indicam uma maior probabilidade de desenvolver a doença, e valores menores que este conferem uma certa proteção contra o desenvolvimento da patologia.



#### IV.2c-Soluções

• $\text{AgNO}_3$	Reagente/Solução Estoque $\text{AgNO}_3$ $\text{H}_2\text{O}$ dd q.s.p 1000 ml	Quantidade 2,02g	Concentração final 0,2%
• $\text{Na}_2\text{CO}_3$	Reagente/Solução Estoque $\text{Na}_2\text{CO}_3$ $\text{H}_2\text{O}$ dd q.s.p 500 ml	Quantidade 14,8g	
• Persulfato de Amônio	Reagente/Solução Estoque APS $\text{H}_2\text{O}$ dd q.s.p 10 ml	Quantidade 1g	Concentração final 10%
• $\text{HNO}_3$	Reagente/Solução Estoque $\text{HNO}_3$ $\text{H}_2\text{O}$ dd q.s.p 1000 ml	Quantidade 15,4 ml	Concentração final 1%

## V-RESULTADOS

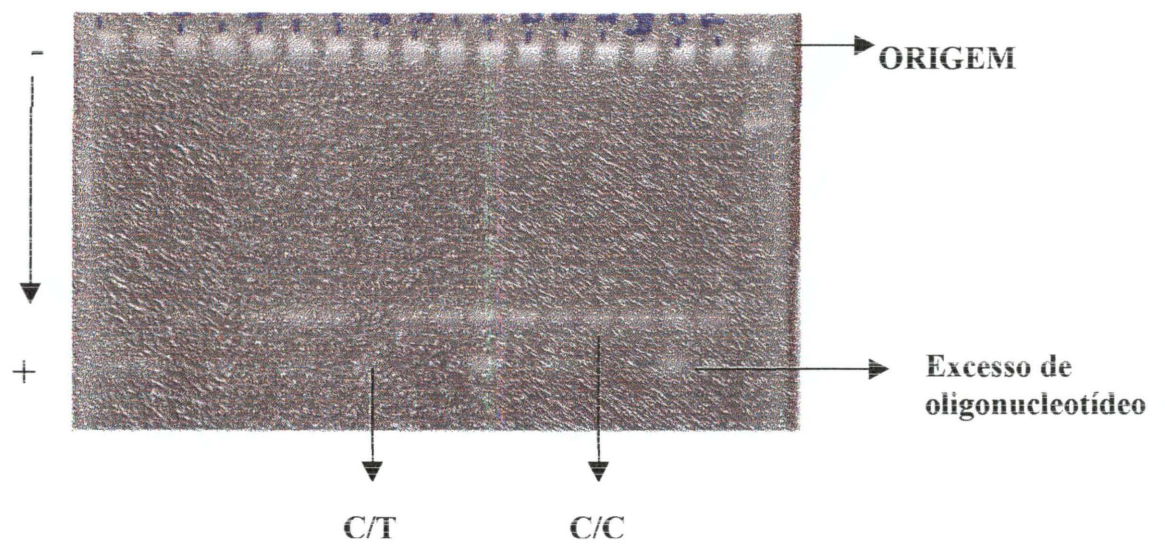
Após a PCR alelo-específica, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose. Para indivíduos homozigotos C/C uma banda de 114 pb foi visualizada, enquanto homozigotos T/T eram determinados por uma banda de 84 pb (figura 8). Os heterozigotos C/T eram determinados pela presença das duas bandas acima. Indivíduos com genótipos duvidosos tiveram seu DNA reamplificado e analisado em gel de poliacrilamida, que permite uma melhor separação das bandas (figura 9).

Os indivíduos analisados foram separados por grupo étnico (negróides e caucasóides) para estimar frequências alélicas e genotípicas por contagem direta (tabelas 3 e 4, respectivamente). O teste de homogeneidade foi aplicado, buscando verificar se essas frequências diferiam entre caucasóides e negróides para pacientes e controles. O resultado mostrou diferenças significativas entre esses dois grupos (tabela 5). Ambos os subgrupos das amostras de pacientes e controles encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 6).

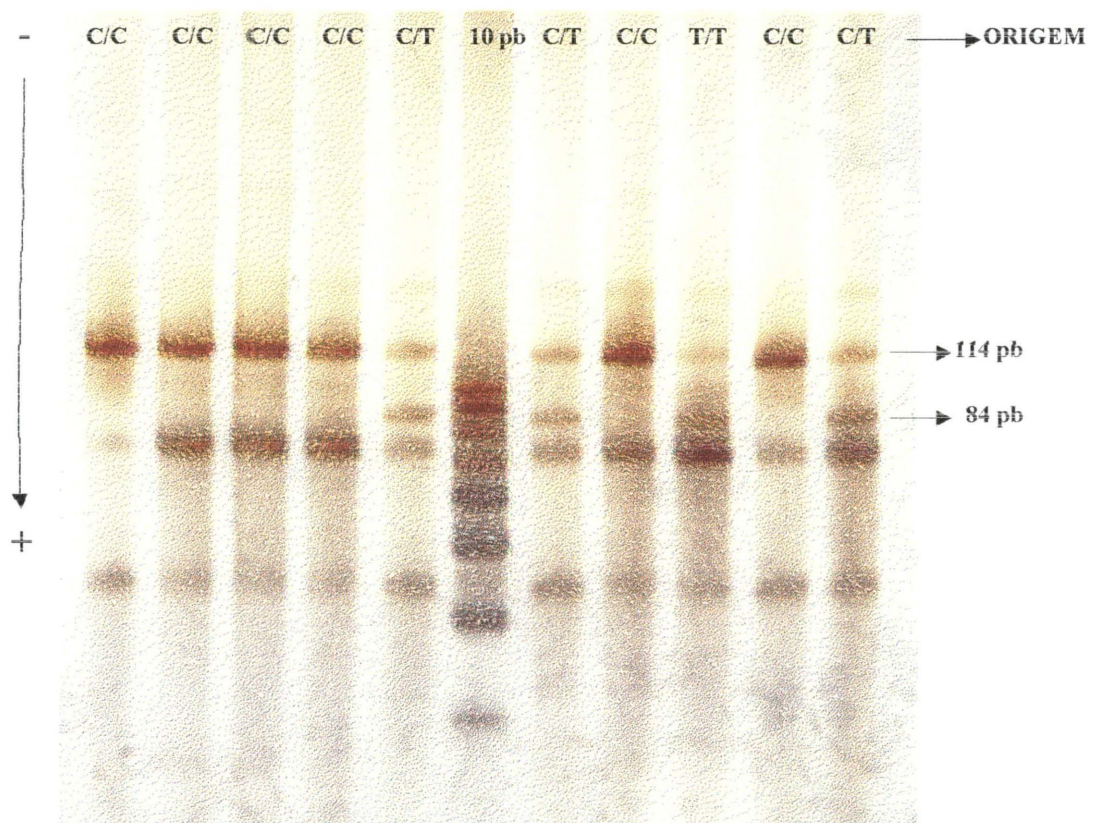
**Tabela 3.** Frequências alélicas para os subgrupos de pacientes e controles.

GRUPO	SUBGRUPO	ALELO	FREQÜÊNCIA (%)
<i>PACIENTES</i>	<i>Caucasóides</i> <i>(n=81)</i>	<i>FASL *C</i>	98,2
		<i>FASL *T</i>	1,8
	<i>Negróides</i> <i>(n=62)</i>	<i>FASL *C</i>	90,3
		<i>FASL *T</i>	9,7
<i>CONTROLES</i>	<i>Caucasóides</i> <i>(n=123)</i>	<i>FASL *C</i>	91,1
		<i>FASL *T</i>	8,9
	<i>Negróides</i> <i>(n=61)</i>	<i>FASL *C</i>	90,1
		<i>FASL *T</i>	9,9

*n*= número de indivíduos



**Figura 8.** Eletroforese de produtos de PCR do gene *FASL* em gel de agarose.



**Figura 9.** Eletroforese de produtos de PCR do gene *FASL* em gel de poliacrilamida.



**Tabela 4.** Frequências genotípicas para os subgrupos de pacientes e controles.

GRUPO	SUBGRUPO	GENÓTIPO	FREQUÊNCIA	
			(%)	n=
PACIENTES	<i>Caucasóides</i> (n=81)	<i>C/C</i>	96,30	78
		<i>C/T</i>	3,70	3
		<i>T/T</i>	0,0	0
	<i>Negróides</i> (n=62)	<i>C/C</i>	82,26	51
		<i>C/T</i>	16,13	10
		<i>T/T</i>	1,61	1
CONTROLES	<i>Caucasóides</i> (n=123)	<i>C/C</i>	82,93	102
		<i>C/T</i>	16,26	20
		<i>T/T</i>	0,81	1
	<i>Negróides</i> (n=61)	<i>C/C</i>	80,33	49
		<i>C/T</i>	19,67	12
		<i>T/T</i>	0,0	0

n= número de indivíduos

**Tabela 5.** Teste de homogeneidade entre os subgrupos de pacientes e controles.

GRUPO	SUBGRUPO	P	s.e
<i>PACIENTES</i>	<i>Caucasóides X Negróides</i>	0,005260	0,000722
<i>CONTROLES</i>	<i>Caucasóides X Negróides</i>	0,846800	0,003178

P: probabilidade

s.e: erro padrão

**Tabela 6.** Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os subgrupos de pacientes e controles.

GRUPO	SUBGRUPO	P
<i>PACIENTES</i>	<i>Caucasóides</i>	≈ 1
	<i>Negróides</i>	0.44427
<i>CONTROLES</i>	<i>Caucasóides</i>	≈ 1
	<i>Negróides</i>	≈ 1

P: probabilidade

As frequências alélicas (tabela 7) e genotípicas (tabela 8) foram comparadas entre pacientes e controles, subdivididos de acordo com sua origem étnica (predominantemente européia / mulatos e negros), testando-se a significância dos desvios através do programa RXC (Miller, 1997). A estimativa do grau de associação entre os caracteres estudado e pênfigo foliáceo foi realizada através do cálculo da razão de probabilidade (*odds ratio* – OR). Não foi possível avaliar as possíveis associações entre frequências de indivíduos pacientes e controles portadores das variantes para a posição –843 do gene *FASL*, pois em ambos os grupos étnicos uma das variantes apresentava frequência nula. Em todas as análises acima foram encontradas associações para o subgrupo de pacientes e controles caucasóides, enquanto o subgrupo dos negróides evidenciou ausência de associação entre os fatores analisados e a doença estudada (tabelas 7 e 8). Para minimizar a chance de ocorrência de erro estatístico do tipo I (rejeição da hipótese nula sendo ela verdadeira), considerando-se que foram feitas múltiplas comparações entre pacientes e controles, aplicamos a correção de Bonferroni, que consiste em multiplicar o valor *p* pelo número de comparações independentes entre pacientes e controles (no caso, 2).

Em caucasóides, o alelo *FASL\*T* encontra-se em menor frequência em pacientes do que em controles, mostrando dessa forma, uma associação negativa com a doença. O contrário ocorre com o alelo C para a posição analisada. Conseqüentemente, o genótipo C/C encontra-se associado positivamente com pênfigo foliáceo enquanto o heterozigoto mostra associação negativa.

**Tabela 7.** Análise de associação considerando as frequências alélicas para a posição –843 do gene *FASL* para o subgrupo de pacientes e controles.

<i>Alelo</i>	<i>Pacientes (n=)</i>	<i>%</i>	<i>Controles (n=)</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>P</i>
<b><i>Caucasóides</i></b>							
<i>FASL*C</i>	159	98,2	224	91,1	5,21	1,53 – 17,69	0,00452
<i>FASL*T</i>	3	1,8	22	8,9	0,19	0,06 - 0,65	0,00272
<b><i>Negróides</i></b>							
<i>FASL*C</i>	112	90,3	110	90,7	1,02	0,44 – 2,36	≈ 1
<i>FASL*T</i>	12	6,7	12	8,8	1,08	0,46 – 2,51	≈ 1

**OR:** *odds ratio*

**p:** probabilidade, após correção de Bonferroni

**n=** número de indivíduos

**Tabela 8.** Análise de associação considerando as frequências genotípicas para a posição -843 do gene *FASL* para o subgrupo de pacientes e controles.

<i>Genótipo</i>	<i>Pacientes (n=)</i>	<i>%</i>	<i>Controles (n=)</i>	<i>%</i>	<i>OR</i>	<i>IC (95%)</i>	<i>P</i>
<b><i>Caucasóides</i></b>							
C/C	78	96,3	102	82,9	5,35	1,54 – 18,59	0,00121
C/T	3	3,7	20	16,3	0,2	0,06 – 0,69	0,01508
T/T	0	0,0	1	0,8	NA	NA	NA
<b><i>Negróides</i></b>							
C/C	51	82,7	49	80,3	1,14	0,46 – 2,81	0,823680
C/T	10	16,3	12	19,7	0,79	0,31 – 1,98	0,646040
T/T	1	1,6	0	0,0	NA	NA	NA

NA: não analisado, devido ao número reduzido de indivíduos com este genótipo

OR: odds ratio

p: probabilidade, após correção de Bonferroni

n= número de indivíduos



## VI-DISCUSSÃO

Não restam dúvidas da importância do sistema Fas/FasL na regulação da resposta imune e na citotoxicidade mediada por células. Já foi visto que esse complexo tem importante papel na maturação de linfócitos durante o estágio de iniciação da resposta imune, bem como controle desta durante a fase efetora, com redução do número de clones de linfócitos (LYNCH e cols., 1995). O complexo do receptor Fas e seu ligante também encontra-se envolvido na eliminação de células-alvo por células T. Além disso, medeiam a apoptose de linfócitos B ativados e linfócitos T autorreativos na periferia, contribuindo para a manutenção de tolerância ao próprio, apesar desse sistema não estar envolvido diretamente na seleção tímica (LYNCH e cols., 1995, DE MARIA e cols., 1998).

A posição variável do gene *FASL* analisada durante esse trabalho foi uma substituição citosina para guanina na posição -843 da região promotora. Polimorfismos nesta região podem estar contribuindo para doenças autoimunes, através de alterações nos níveis, locais e tempo de expressão do ligante de Fas. Foi visto que em doenças, como por exemplo a síndrome linfoproliferativa, a expressão reduzida de moléculas do sistema Fas/FasL leva à redução dos níveis apoptóticos, com conseqüente aumento no número de linfócitos. Já no lúpus eritematoso sistêmico, o excesso de expressão conduz à excessiva ativação de linfócitos periféricos, enquanto na diabetes mellitus tipo I, esta expressão alterada de FasL promove destruição de células  $\beta$ -pancreáticas (NOLSOE e cols., 2002).

Em estudo recente constatou-se a presença aumentada da forma solúvel de FasL no soro de pacientes com pênfigo que não estão sob tratamento. Este excesso do ligante de Fas desencadearia apoptose de queratinócitos ao reconhecer o receptor Fas na superfície celular destes, levando a conseqüente formação de bolhas (PUVIANI e cols., 2003).

No presente trabalho, verificamos associação entre as variantes da posição -843 e pênfigo foliáceo, somente para o grupo de caucasóides. A frequência do genótipo C/T foi 3,7 em pacientes e 16,3% em controles. A OR de 0,2 e  $p=0,015$ , nos mostram que a diferença entre pacientes e controles é significativa no grupo caucasóide, e que este genótipo está associado à resistência. O alelo *FASL*\*C possui frequências de 98,2% em pacientes e 91,1% em controles. O valor da OR nos mostra que indivíduos portadores deste alelo são cerca de

cinco vezes mais susceptíveis a doença que os portadores do outro alelo, com níveis de significância de  $p=0,0045$ . No grupo dos negróides não há diferenças significativas de frequências genotípicas e alélicas entre pacientes e controles.

Várias hipóteses tem sido sugeridas para esta diferença de associação entre grupos étnicos. Muitos fatores contribuem para a heterogeneidade de populações ao se trabalhar com doenças de etiologia complexa e multifatorial. Além dos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, deve-se considerar a genética de populações. A população brasileira é miscigenada e sua composição étnica difere de acordo com a região do país (PETZL-ERLER, 1999). Dessa forma, vários fatores podem estar contribuindo para a heterogeneidade entre negróides e caucasóides encontrada no presente estudo, entre eles: pareamento inadequado entre as amostras de pacientes e controles caucasóides, associação secundária devido ao desequilíbrio de ligação e diferenças de desequilíbrio de ligação entre populações ou, ainda, o gene pode estar contribuindo para a patogênese da doença em uma população e na outra não.

Pacientes e controles caucasóides podem ter origens de diferentes regiões da Europa, diferindo assim no repertório de alelos encontrados. Um outro aspecto interessante, é que o grupo de pacientes pode encontrar-se miscigenado com indígenas. Paralelamente ao presente trabalho foram tipados sessenta indivíduos da tribo indígena Kaingang de Ivaí, observando-se 100% de indivíduos homozigotos C/C. A frequência do alelo *FASL*\*C em pacientes caucasóides (98,2%) foi intermediária a de controles caucasóides (91,1%) e indígenas (100%).

Porém, associações secundárias podem ser encontradas devido ao desequilíbrio de ligação com outros genes. As populações podem não diferir somente no seu repertório de alelos e frequências alélicas, como visto acima, mas também no desequilíbrio de ligação com alelos de outros genes. Nesse caso, um determinado alelo pode mostrar-se associado devido ao desequilíbrio de ligação com alelos de outros genes que não estão sendo analisados. Podem haver também, diferenças de desequilíbrio de ligação entre negróides e caucasóides. Nesse caso, em caucasóides, uma das variantes analisadas estaria em desequilíbrio com o alelo de susceptibilidade de um gene não analisado, conferindo uma associação positiva, enquanto em negróides ambas as variantes analisadas poderiam encontrar-se em fase haplotípica com o alelo de susceptibilidade, promovendo assim uma associação positiva fraca ou nula. Em caso de associação secundária, as variantes analisadas serviriam como marcador genético de

susceptibilidade ou resistência, porém, não estariam influenciando de fato a susceptibilidade/resistência à doença.

Pacientes com doenças complexas e multifatoriais podem estar manifestando essa doença devido à ação de uma combinação de fatores que contribuem para a patogênese (PETZ-ERLER, 1999). É possível que a constelação de fatores que desencadeiam pênfigo foliáceo em negróides seja diferente daquela encontrada em pacientes caucasóides. Desse modo, o gene estudado no presente trabalho poderia ser de menor relevância em um grupo étnico do que em outro, dependendo do conjunto de fatores genéticos e ambientais que estão sendo combinados.

Para corroborar os resultados encontrados na análise do gene *FASL*, estudos posteriores serão efetuados, utilizando-se outra amostra de pacientes com pênfigo foliáceo. É importante salientar que a posição -843 deste gene só foi analisada em estudo de segregação em famílias e nunca em um estudo caso-controle (STUCK e cols., 2003). Além disso, não foram encontrados trabalhos de análise do polimorfismo dessas variantes em nenhuma população mundial que pudessem auxiliar no conhecimento da distribuição de frequências em caucasóides e negróides. Na sequência do trabalho, amostras caucasóides, orientais, negróides e indígenas serão analisadas em relação ao polimorfismo das variantes da posição -843 da região promotora do gene *FASL*.

De toda forma, *FASL* continua sendo um gene candidato para estudo de doenças autoimunes. Alterações na estrutura molecular, diferenças na expressão gênica e interação com outras moléculas podem estar influenciando na via apoptótica que leva a homeostase do organismo e manutenção da tolerância ao próprio. Estudos da interação entre linfócitos T e células-alvo, contribuiriam para o melhor entendimento da origem e evolução dos mecanismos de autoimunidade.

## VII-CONCLUSÃO

Uma associação negativa do alelo *FASL*\*T da posição -843 do gene *FASL* com PF foi detectada no grupo dos caucasóides.

Em negróides, nenhuma associação foi detectada.

As frequências alélicas encontradas na população caucasóide foram: *FASL*\*C 91,1% e *FASL*\*T 8,9%. Em negróides 90,2% e 8,8%, respectivamente.



## VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BELL DA, MORRISON B, VANDENBYGAART P. Immunogenetic DNA related factors: Nucleosone spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes. **J Clin Invest** 85: 1487-1496, 1990.
- BELLGRAU D, GOLD D, SELAWRY H, MOORE J, FRANZUSOFF A, DUKE RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. **Nature** 377: 630-632, 1995.
- BOLSTAD AI, WARGELUIS A, NAKKEN B, HAGA HJ, JONSSON R. Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjögren's syndrome. **The J of Rheumatol** 27: 2397-2405, 2000.
- CAMPBELL R, AIOK V, CUNHA P, HANS-FILHO G, ALVES G, ROCHA R, FRIEDMAN H. Endemic pemphigus foliaceus/fogo selvagem. **Anais Brasileiros de Dermatologia** 76:13-33, 2001.
- CERNA M, FERNANDEZ-VINA M, FRIEDMAN H, MORAES JR, MORAES ME, DIAZ LA, STASTNY P. Genetic markers for susceptibility to endemic brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in Xavante indians. **Tissue Antigens** 42: 138-140, 1993.
- COUNTER CE. The disease called "wildfire". **Arch dermatol** 80: 49-55, 1959.
- CHIDGEY MAJ. Desmosomes and disease. **Histol Histopathol** 12: 1159-1168, 1997.
- DE MARIA R, TESTI R. Fas-FasL interactions: a common pathogenetic mechanism in organ-specific autoimmunity. **Immunol Today** 19: 121-125, 1998.
- DELANEY C, PAVLOVIC D, HOORENS A, PIPELEERS D, EIZIRIK D. Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. **Endocrinology** 138: 2610-2614, 1997.
- DIAZ LA, SAMPAIO SAP, RIVITTI EA, MARTINS CR, CUNHA PR, LOMBARBI C, ALMEIDA FA, CASTRO RM, MACCA ML, LAVRADO C, HANS-FILHO G, BORGES P, CHAUL A, MINELLI L, EMPINOTTI JC, FRIEDMAN H, CAMPBELL I, LABIB RS, ANHALT GJ. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): I. Clinical features and immunopathology. **J Am Acad Dermatol** 20: 657-669, 1989a.
- DIAZ LA, SAMPAIO SAP, RIVITTI EA, MARTINS CR, CUNHA PR, LOMBARBI C, ALMEIDA FA, CASTRO RM, MACCA ML, LAVRADO C, HANS-FILHO G, BORGES P, CHAUL A, MINELLI L, EMPINOTTI JC, FRIEDMAN H, CAMPBELL I,

- LABIB RS, ANHALT GJ. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem): II. Current and historic epidemiologic studies. **J Invest Dermatol** 92: 4-12, 1989b.
- EATON DP, DIAZ LA, HANS-FILHO G, SANTOS VD, AOKI V, FRIEDMAN H, RIVITTI EA, SAMPAIO AS, GOTTLIEB MS, GIUDICE GJ, LOPEZ A, CUPP EW. Comparison of black fly species (Diptera: Simuliidae) on an amerindian reservation with a high prevalence of fogo selvagem to neighboring disease-free sites in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The cooperative group on fogo selvagem research. **J Med Entomol** 35: 120-131, 1998.
- ELKON KB. Apoptosis and autoimmunity. **J Rheumatol** 24: 6-7, 1997.
- GRIFFITH TS, BRUNNER T, FLETCHER SM, GREN DR, FERGUSON TA. Fas ligand-induce apoptosis as a mechanism of immune privilege. **Science** 270: 1189-1192, 1995.
- GUO S, THOMPSON E. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics** 48: 361-372, 1992.
- HANS-FILHO G, AOKI V, RIVITTI E, EATON D, LIN MS, DIAZ LA. The cooperative group on fogo selvagem research. Endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) – 1998. **Clin Dermatol** 17: 225-235, 1999.
- HARMAN KE, BLACK MM. High-dose intravenous immune globulin for the treatment of autoimmune blistering diseases: an evaluation of its use in 14 cases. **Br J Dermatol** 140: 865-874, 1999.
- HOLMES CH, SIMPSON KL. Complement and pregnancy: new insights into the immunobiology of the fetomaternal relationship. **Baillieres Clin Obstet Gynaecol** 6: 439-460, 1992.
- HOLUBAR K. Pemphigus – an atavism?. **Dermatologica** 178: 6-7, 1989.
- ITOH N, YONEHARA S, ISHII A, YONEHARA M, MIZUSHIMA S, SAMESHIMA M, HASE A, SETO Y, NAGATA S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell** 66: 233-243, 1991.
- JONES JC, ARNN J, STACHELIN LA. Human antibodies against desmosomes: possible causative factors in pemphigus. **Proc Natl Acad Sci** 81: 2781-2785, 1984.
- LAMHAMEDI S, SHIRWAN H. A expression of FasL as a stable cell-surface molecule is important to its apoptotic function. **Transplantation Proceedings** 33:259, 2001.
- LAHIRI DK, NURNBERGER JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of DNA from blood for FRLP studies. **Nucleic Acid Res** 19: 5444, 1991.

- LE BOUTEILLER P, RODRIGUEZ AM, MALLET V, GIRR M, GUILLAUMEUX T, LENFANT F. Placental expression of HLA class I genes. **Am J Reprod Immunol** 35: 216-225, 1996a.
- LE BOUTEILLER P. HLA class I genes and products. In: HLA and the maternal-fetal relationship. **Landes Pub Austin** : 51, 1996b.
- LOMBARDI C, BORGES PC, CHAUL A, SAMPAIO SAP, RIVITTI EA, FREIDMAN H, MARTINS CR, SANCHES JÁ, CUNHA PR, HOFFMANN RG, DIZ LA. The cooperative group on fogo selvagem research. Environmental risk factors in endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem). **J Invest Dermatol** 98: 847-850, 1992.
- LYNCH DH, RAMSDELL F, ALDERSON MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. **Immunology Today** 16:569-573, 1995.
- MILLER, MP. **RxC: a program for the analysis of contingency tables via metropolis algorithm computer**. Departmento of biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997.
- MINELLI L. Pênfigo foliáceo sul-americano no estado do Paraná, Brasil, 1941-1980. **Bol Of Saint Panam** 101: 114-121, 1986.
- MOHAN C, ADAMS S, STANIK V, DATTA SK. Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lúpus. **J Exp Med** 177: 1367-1381, 1993.
- MORAES JR, MORAES ME, FERNANDEZ-VINA M, DIAZ LA, FRIEDMAN H, CAMPBELL, IT, ALVAREZ RR, SAMPAIO SAP, RIVITTI E, STASTNY P. HLA antigens and risk for development of pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in endemic areas of Brazil. **Immunogenetics** 33: 388-391, 1991.
- MORAES ME, FERNANDEZ-VINA M, LAZARO A, DIAZ LA, FILHO GH, FRIEDMAN H, RIVITTI E, AOKI V, STATSTNY P, MORAES JR. Na epitope in the third hypervariable region of the DBR1 gene is involved in the susceptibility to endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) in three different Brazilian populations. **Tissue Antigens** 49: 35-40, 1997.
- NAGATA S, GOLSTEIN P. The death factor. **Science** 267: 1449-1456, 1995.
- NOLSOE RL, KRISTIANSEN OP, LARSEN ZM, JOHANNESSEN J, POCIOT F, MANDRUP-POULSEN T. Complete mutation scan of the human Fas ligand gene: Linkage studies in Type I diabetes mellitus families. **Diabetologia** 45: 134-139, 2002.
- O'BRIEN B, HARMON B, CAMERON D, ALLAN D. Apoptosis is the mode of beta-cell death responsible for the development of IDDM in the nonobese diabetic (NOD) mouse. **Diabetes** 46: 750-757, 1997.

- O'CONNELL JO, O'SULLIVAN GC, COLLINS JK, SHANAHAN F. The Fas conterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer expressin Fas ligand. **J Exp Med** 184: 1075-1082, 1996.
- PAVONI DP. Estudo de associação entre variantes dos genes HLA-DRB e CTLA4 e pênfigo foliáceo endêmico (fogo selvagem). **Dissertação do Curso de Pós-graduação em Genética-UFPR**, 2000.
- PAVONI DP, ROXO VS, MARQUART FILHO A, PETZL-ERLER ML. Dissecting the associations of endemic pemphigus foliaceus (fogo selvagem) with HLA-DRB1 alleles and genotypes. Dominant protection, dose-dependent suscetibility. **Genes and Immunity** 4: 110-116, 2003.
- PETZL-ERLER ML, SANTAMARIA J. Are HLA class II genes controlling susceptibility and resistance to Brazilian pemphigus foliaceus (fogo selvagem)? **Tissue Antigens** 33: 408-414, 1989.
- PETZL-ERLER ML. Genetics of the immune responses and disease susceptibility. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian association fo thee Advancement of Science** 51(3/4): 199-211, 1999.
- PROBST CM. **CONVERT: uma ferramenta computacional auxiliar no estudo de polimorfismos genéticos, versão 1.1**. Laboratório de Genética Molecular Humana, Departamento de Genética, UFPR, Curitiba, 1998.
- PUVIANI M, MARCONI A, COZZANI E, PINCELLI C. Fas ligand in pemphigus sera induces keratinocyte apoptosis trough the activation of caspase-8. **J Invest Dermatol** 120(1): 167-167, 2003.
- SAKATA K, SAKATA A, KONG L, DANG L, TALAL N. Role os Fas/FasL interactions in physiology and pathology: the good and the bad. **Clin Immunol and Immunopathol** 87: 1-7, 1998.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. **Molecular cloning-a laboratory manual**. 2<sup>o</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, 1989.
- SCHNEIDER RF, ROESSLY D, EXCOFIER L. **ARLEQUIN: a software for population genetic data analysis, version 2000**. Genetics and Biometry Laboratories, Dept. of Antrophology, University of Genève, Genève, 2000.
- SIEGEL RM, FLEISHER TA. The role of Fas and relateddeath receptors in autoimmune and other disease states. **J Allergy Clin Immunol** 103: 729-738, 1999.
- SVEJGAARD A, JERSILD C, STAUB-NIELSEN L, BODMER WF. HLA antigens ande disease – statistical and genetical considerations. **Tissue Antigens** 4: 95-105, 1974.



- STUART PM, GRIFFITH TS, USUI N, PEPOSE J, YO X, FERGUSON TA. A CD95 ligand-induce apoptosis is necessary for corneal allograft survival. **J Clin Invest** 99: 396-402, 1997.
- STUCK BJ, PANI MA, BESROUR F, SEGNI M, KRAUSE M, USADEL KH, BADENHOOP K. Fas ligand gene polymorphism are not associated with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease. **Human Immunol** 64: 285-289, 2003.
- SUDA T, TAKAHASHI T, GOLSTEIN P, NAGATA S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell** 75: 1169-1178, 1993.
- TAFURI A, ALFERINK J, MÖLLER P, HÄMMERLING GJ, ARNOLD B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. **Science** 270: 630-633, 1995.
- TAKAHASHI T, TANAKA M, BRANNAN CI, JENKINS NA, COPELAND NG, SUDA T, NAGATA S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. **Cell** 76:969-976, 1994a.
- TAKAHASHI T, TANAKA M, INAZAWA J, ABE, T, SUDA T, NAGATA S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. **Int. Immun** 6: 1567-1574, 1994b.
- TAX WJM, KRAMERS C, VAN BERDEN MCJ. Apoptosis, nucleosomes and nephritis in systemic lupus erythematosus. **Kidney Int** 48: 666-673, 1995.
- THIVOLET J. Pemphigus: past, present and future. **Dermatology** 189 (supl 2): 26-29, 1994.
- VIARD I, WEHRLI P, BULLANI R, SCHNEIDER P, HOLDER N, SOLOMON D, HUNZIKER T, SAURAT JH, TSCHOPP J, FRENCH LE. Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. **Science** 282: 490-493, 1998.
- WO J, WILSON J, HE J, XIANG L, SCHUR PH, MOUTZ JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. **J Clin Invest** 98: 1107-1113, 1996.
- WOOLF B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann Hum Genet** 19: 251-253, 1955.
- YONEHARA S, ISHIOKA, YONEHARA M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. **J Exp Med** 169: 1747-1756, 1989.

ZAYAS MD, LUCAS M, SOLANO F, FÉRNANDEZ-PÉREZ MJ, IZQUIERDO G.  
Association of a CA repeat polymorphism upstream of the Fas ligand gene with multiple sclerosis. **J of Neuroimmunol** 116: 238-241, 2001.